

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Magdalena Dutka

OCENA WPŁYWU ZABURZEŃ HOMEOSTAZY ŻELAZA
NA PRZEBIEG POWIKŁAŃ INFEKCYJNYCH
I NIEINFEKCYJNYCH U CHORYCH PODDANYCH
ALOTRANSPLANTACJI KOMÓREK MACIERZYSTYCH
HEMATOPOEZY

Assessment of disrupted iron homeostasis's impact on the course of
infectious and non-infectious complications in patients undergoing
allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Hellmann
Gdańsk 2017

Promotor: dr hab. med. Maria Bieniaszewska

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----|
| Wykaz stosowanych skrótów | 3 |
| 1. Wstęp..... | 6 |
| 1.1. Gospodarka ogólnoustrojowa żelazem..... | 6 |
| 1.1.1. Wprowadzenie | 6 |
| 1.1.2. Regulacja homeostazy tkankowej żelaza..... | 8 |
| 1.1.3. Mechanizmy wewnątrzkomórkowe homeostazy żelaza..... | 11 |
| 1.2. Udział żelaza w procesach metabolicznych i immunologicznych | 12 |
| 1.2.1. Wpływ żelaza na czynność układu immunologicznego | 13 |
| 1.3. Stany przeładowania żelazem..... | 16 |
| 1.3.1. Wiadomości ogólne..... | 16 |
| 1.3.2. Rola ferrytyny..... | 18 |
| 1.3.3. Zakażenia w stanach przeładowania żelazem..... | 19 |
| 1.4. Alotransplantacja komórek krwiotwórczych..... | 21 |
| 1.4.1. Wiadomości ogólne | 21 |
| 1.4.2. Zaburzenia gospodarki żelazowej u pacjentów poddanych alotransplantacji..... | 22 |
| 1.4.3. Metody oceny zasobów żelaza ogólnoustrojowego i tkankowego..... | 22 |
| 1.4.4. Powikłania transplantacyjne a zaburzenia homeostazy żelaza | 25 |
| 2. Założenia i cel badań..... | 28 |
| 3. Materiał i metody | 30 |
| 3.1. Protokół badania | 30 |
| 3.2. Charakterystyka grupy pacjentów | 31 |
| 3.3. Opis stosowanych metod badawczych, materiał badany | 35 |
| 3.3.1. Ocena stopnia przeładowania żelazem..... | 35 |
| 3.3.2. Powikłania transplantacyjne..... | 38 |
| 3.4. Analiza statystyczna..... | 46 |
| 4. Wyniki | 47 |
| 4.1. Ocena spichrzenia żelaza..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.1.1. Stężenie ferrytyny jako wyznacznik stopnia przeładowania żelazem | 47 |
| 4.1.2. Badanie MRI, jako wskaźnik stopnia spichrzenia żelaza ogólnoustrojowego | 56 |
| 4.2. Zaburzenia gospodarki żelazowej a wystąpienie powikłań infekcyjnych we wczesnym okresie po aloSCT | 58 |
| 4.2.1. Stężenie Ferrytyny a powikłania infekcyjne | 58 |
| 4.2.2. MRI a powikłania infekcyjne | 63 |
| 4.3. Zaburzenia gospodarki żelazowej a wystąpienie powikłań nieinfekcyjnych we wczesnym okresie po aloSCT | 65 |
| 4.3.1. Częstość występowania i stopień ciężkości najczęstszych powikłań nieinfekcyjnych | 65 |
| 4.3.2. Stopień gromadzenia żelaza a najczęstsze powikłania nieinfekcyjne | 67 |
| 5. Omówienie wyników i dyskusja | 68 |
| 6. Wnioski | 82 |
| 7. Streszczenie | 83 |
| 8. Summary | 86 |
| 9. Sspis tabel | 89 |
| 10. Spis rycin | 90 |
| 11. Piśmiennictwo | 92 |

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|------------------|--|
| aGvHD | ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi |
| AIAT | aminotransferaza alaninowa |
| aloSCT | alogeniczne przeszczepienie komórek macierzystych hematopoezy |
| APC | komórka prezentująca antygen |
| AspAT | aminotransferaza asparaginianowa |
| Bil | bilirubina całkowita |
| BMP6 | bone morphogenetic protein 6 |
| BMPR | receptor białka BMP |
| CRP | Białko C - reaktywne |
| CTCAE | Common Terminology Criteria for Adverse Events |
| DcytB | dwunastniczy cytochrom B |
| DMT1 | divalent metal transporter 1 / transporter metali dwuwartościowych |
| DNA | kwask deoksyrybonukleinowy |
| DWI | diffusion-weighted imaging |
| ECOG–WHO | Eastern Cooperative Oncology Group – World Health Organization |
| Falk | fosfataza alkaliczna |
| FANCF | proteina grupy J anemii Fanconiego |
| FDA | Agencja do Spraw Żywności i Leków |
| Fe ²⁺ | żelazo dwuwartościowe, jon żelazawy |
| Fe ³⁺ | żelazo trójwartościowe, jon żelazowy |
| FHCRC | Fred Hutchinson Cancer Research Center |
| F-S | grupa prostetyczna żelazowo -siarkowa |
| g | gram |
| GDF 15 | czynnik wzrostu i różnicowania 15 |
| GGTP | gamma-glutamylotranspeptydaza |
| GRE | gradient echa |
| GvHD | choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi |

| | |
|--------------|--|
| GvL | efekt przeszczep przeciwko białaczce |
| HAMP | hepcidin antimicrobial peptide / białko przeciwbakteryjne hepcydyna |
| HCT-CI | współczynnik chorób współistniejących specyficzny dla SCT |
| HFE | hemochromatosis-related membrane protein, białko błonowe związane z hemochromatozą |
| HJV | hemojuvelina |
| HLA | antygeny zgodności tkankowej |
| HO-1 | hemoksygenaza 1 |
| HSCT | transplatacja hematopoetycznych komórek macierzystych |
| HUS | zespół hemolityczno – mocznicowy |
| Hz | Hertz |
| IL 6 | interleukina 6 |
| IL1 β | interleukina 1 beta |
| INF γ | interferon gamma |
| iNOS | syntetaza tlenku azotu |
| IPS | idiopantyczne zapalenie płuc |
| JAK | kinaza Janus |
| KKCz | koncentrat krwinek czerwonych |
| LIC | liver iron concentration, stężenie żelaza wątrobowego |
| LPS | lipopolisacharyd |
| Mfn | mitoferyna |
| mg | miligram |
| mg / g sm. | miligram na gram suchej masy |
| MRI | rezonans magnetyczny |
| mRNA | sygnałowy kwas rybonukleinowy |
| Ms | milisekunda |
| Mt-2 / | metryptaza 2 / przezłonowa proteaza serynowa 6 |
| NADPH | fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego |
| NK | limfocyty naturalnie zabijające – natural killers |
| NO | tlenek azotu |
| Nramp-1 | natural resistance-associated macrophage protein |
| NRM | śmiertelność nie związana ze wznową |
| NTBI | żelazo niezwiązane z transferyną |

| | |
|-----------------|---|
| OS | całkowite przeżycie |
| OWCI | ogólny wskaźnik ciężkości infekcji |
| OWI | ogólny wskaźnik infekcji |
| PD | gęstość protonów, proton density |
| PFS | przeżycie wolne od progresji |
| ROI | region of interest, rejonów zainteresowania |
| s ⁻¹ | 1 / sekunda |
| SI | signal intensity, siła sygnału |
| SMAD | rodzina białek sygnałowych, (similar to mothers against decapentaplegic) |
| SOS | wątrobowy zespół niedrożności sinusoidalnej |
| STAT 3 | aktywator transkrypcji 3 (signal transducer and activator of transcription 3) |
| STEAP | six membrane epithelial antigen of the prostate |
| TAM | zależna od transplantacji mikroangiopatia |
| Tc | limfocyty T cytotoksyczne |
| TfR1 | receptor transferyny 1 |
| TfR2 | receptor transferyny 2 |
| TLR | toll like receptors |
| TNF α | czynnik martwicy nowotworu alfa |
| TTP | plamica zakrzepowo-małopłytkowa |
| ug | mikrogram |
| umol | mikromol |
| VOD | choroba wenookluzyjna wątroby |
| VOI | vloumen of interest, objętości zainteresowania |

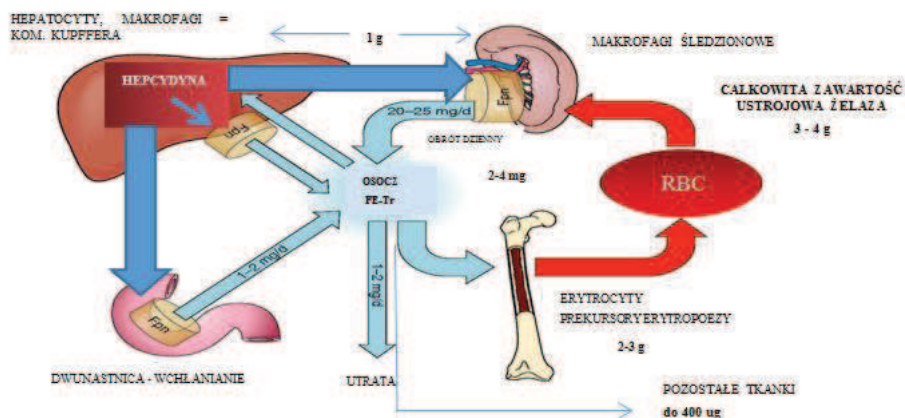
1. WSTĘP

1.1. Gospodarka ogólnoustrojowa żelazem

1.1.1. Wprowadzenie

Żelazo jest istotnym metabolicznie, szeroko rozpowszechnionym pierwiastkiem śladowym, niezbędnym do życia dla większości organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Jego właściwości oksydoredukcyjne polegające na łatwości przenoszenia elektronów sprawiły w toku ewolucji, iż stało się niezbędnym elementem wielu procesów fizjologicznych. Z drugiej strony potencjał oksydoredukcyjny żelaza stanowi o jego działaniach niepożądanych, gdyż pierwiastek ten w formie wolnej staje się toksyczny dla komórek, tkanek i organów. Dlatego też w organizmie żywym żelazo pozostaje związane bezpośrednio z białkami lub za pośrednictwem grup prostetycznych. Połączenia ze związkami organicznymi stanowią jedynie nieznaczną ilość. Mimo, że żelazo jest często występującym, w wielu formach, pierwiastkiem, jego biodostępność jest ograniczona z powodu słabej rozpuszczalności.[1, 2]

Całkowita zawartość żelaza w ustroju ludzkim szacowana jest na 3-4 g. Większość zasobów żelaza (65-75%) podlega przemianom w układzie erythropoetycznym. Pozostała ilość pierwiastka znajduje się w mięśniach, głównie w postaci związanej z mioglobina, w surowicy krwi związanej z transferyną (2-4 mg) oraz w niewielkich ilościach we wszystkich tkankach i komórkach ustroju w celu podtrzymania kluczowych procesów energetycznych i syntetycznych (do 400 ug). Podstawowym miejscem deponowania żelaza zapasowego są makrofagi wątroby i śledziony oraz hepatocyty.



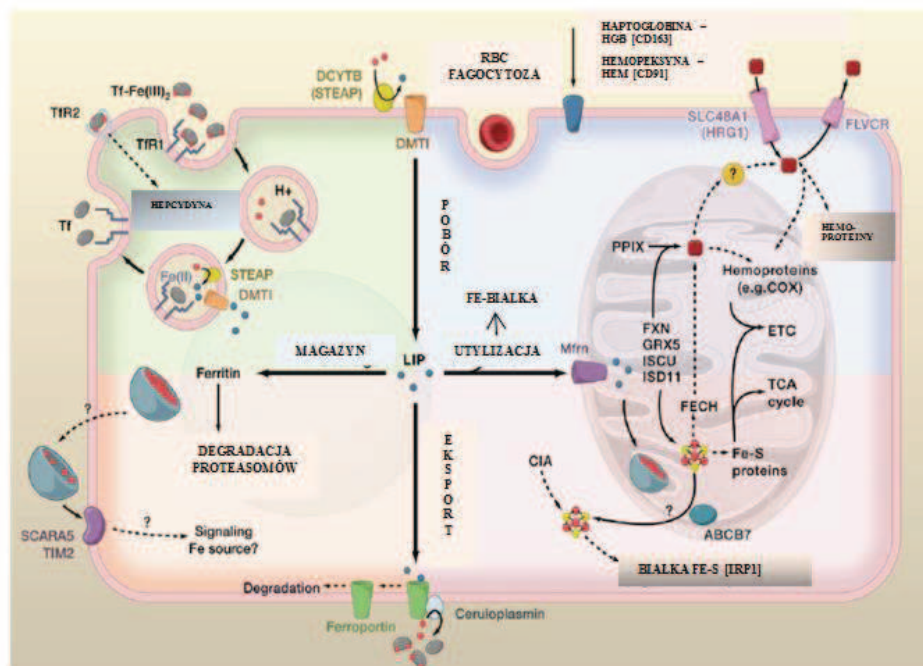
Rycina 1 Zawartość żelaza w organizmie, jego przepływ i regulacja hepcydyną.[1]Ganz, T., *Systemic iron homeostasis*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(4): p. 1721-41. Modyfikacja własna.

Źródłem żelaza w prawidłowo zbilansowanej diecie człowieka są produkty zwierzęce, gdyż w przeciwieństwie do związków organicznych pierwiastka zawartych w roślinach, żelazo hemowe charakteryzuje się większą biodostępnością. Wchłanianie w przewodzie pokarmowym, ze względu na słabą rozpuszczalność soli i związków żelaza, jest ograniczone (z 15 mg/dobę absorpcji ulega 0,1% tj. 1-2 mg [2, 3]), ale wystarczające dla pokrycia średniej utraty. W toku ewolucji wytworzyły się mechanizmy oszczędzające żelazo polegające na wewnętrznej, wewnątrzkomórkowej i międzytkankowej recyrkulacji pierwiastka (20-25 mg/d). Proces ten podlega ścisłej regulacji hormonalnej, w której kluczową rolę odgrywa hepcydyna. Takiej kontroli i regulacji nie podlega proces usuwania pierwiastka z ustroju człowieka, który ograniczony jest do złuszczenia komórek błon śluzowych, skóry i incydentalnych krwawień.

1.1.2. Regulacja homeostazy tkankowej żelaza

Wchłanianie żelaza odbywa się na rąbku szczoteczkowym enterocyta dwunastnicy. Aktywną funkcję spełnia tu receptor metali dwuwartościowych (DMT1), który w rzeczywistości jest kotransporterem jonów metali i wodoru. Jest on bezpośrednio związany z reduktazą żelaza (DcytB, Cybrd1), umożliwiającą wchłanianie pierwiastka poprzez redukcję jonu żelazowego (Fe^{3+}) zawartego w produktach żywnościowych do jonu żelazowego (Fe^{2+}), transportowanego przez błonowo. DMT1 zlokalizowany jest nie tylko na enterocytach, ale również we wszystkich tkankach i strukturach wewnątrzkomórkowych związanych z homeostazą żelaza - hepatocytach, makrofagach, fagolizosomach.[4] Dwuwartościowe żelazo może następnie ulec związaniu z ferrytyną, po uprzednim utlenowaniu pierwiastka do formy trójwartościowej lub ulec uwolnieniu do płynu zewnątrzkomórkowego i osocza poprzez błonę podstawno-boczną enterocyta. W procesie tym bierze udział ferroportyna, białko transbłonowe, sprzężone z oksydazą żelazawą (hafestyną enterocyta, ceruloplazminą hepatocyta) powodującą ponowne przejście formy Fe^{2+} do Fe^{3+} zdolnej następnie do połączenia się z głównym białkiem transportowym osocza – transferyną. Analogiczny mechanizm transportu obecny jest w innych tkankach kluczowych dla homeostazy żelaza – hepatocytach czy makrofagach. W ten sposób uwolnione do płynu pozakomórkowego żelazo dostarczane jest przez transferynę, której cząsteczka wiąże dwa jony żelazowe, do wszystkich tkanek. Wychwyty transferyny wysyczonej pierwiastkiem następuje poprzez swoisty receptor błonowy (TfR1, TfR2). Internalizacja wewnątrzkomórkowa kompleksu następuje w drodze endocytozy. Połączenie transferyny z receptorem ulega re-internalizacji z błoną komórkową, a wolna transferyna (apo-transferyna) może ponownie wiązać jony żelazowe.

Makrofagi charakteryzują się dodatkową drogą internalizacji żelaza poza mechanizmami związanymi z transportem przez błonowy, zależnym od DMT1 czy TfR1. Poprzez naturalne właściwości fagocytarne pochłaniają starzejące się komórki (np. eryocyty), jak również kompleksy hemoglobiny i hemu z ich białkami transportowymi.



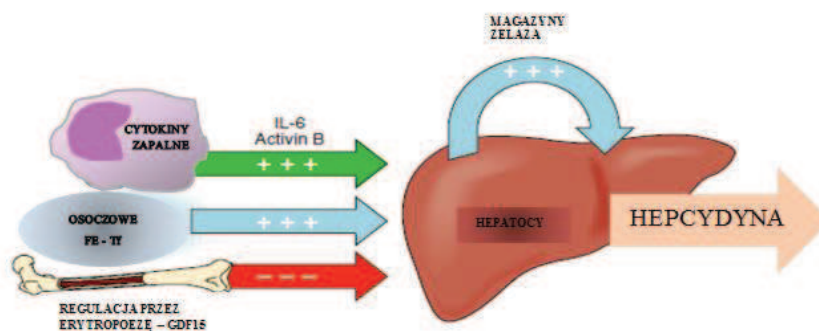
Rycina 2 Proces komórkowego wchłaniania, transportu i magazynowania żelaza. [5]

Hentze, M.W., et al., *Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism*. Cell, 2010. 142(1): p. 24-38. Modyfikacja własna.

Procesami wchłaniania, redystrybucji, wbudowywania i magazynowania żelaza, zawiaduje białko hormonalne hepcydyna, produkowane głównie w wątrobie. W innych tkankach występuje w znikomej ilości i prawdopodobnie wpływa na homeostazę miejscową żelaza.[3]

W sytuacji podwyższonego stężenia żelaza ogólnoustrojowego oraz wewnątrzkomórkowego, hepcydyna wiążąc się z ferroportyną na komórkach docelowych, powoduje internalizację białka, jego ubikwitynację a następnie degradację. Uniemożliwia to przejście pierwiastka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i powoduje obniżenie jego stężenia. Zgromadzone w enterocytach żelazo ulega wydaleniu przez złuszczenie, co poprzez mechanizmy molekularnej regulacji wewnątrzkomórkowej powoduje również obniżenie jego wchłaniania. Odwrotne zjawisko obserwowane jest w przypadku niedoboru mikroelementu.

Jak każdy hormon, hepcydyna podlega złożonym mechanizmom regulacyjnym. Jednym z nich jest dodatnie sprzężenie zwrotne zależne od stężenia żelaza związanego z transferryną czy ferrytyną, a więc odpowiednio jego ilością zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej. Wydzielanie hormonu stymulowane jest również poprzez czynniki prozapalne, liczne cytokiny, głównie interleukinę 6 (IL-6). Odwrotny wpływ obserwowany jest w stanach hipoksji oraz wzmożonej erytropoezy, jednakże mechanizmy prowadzące do hamowania syntezy hepcydyny nie zostały do końca zidentyfikowane. Postulowany jest udział czynnika supresyjnego wytwarzanego przez erytroblasty pod wpływem erytropoetyny np.: GDF15.[6-8] Hepcydyna ulega wydaleniu przez nerki, zatem w stanach ich niewydolności i zaburzonej funkcji może dochodzić do akumulacji hormonu, co wpływa na gromadzenie żelaza tkankowego niedostępnego do prawidłowego krwiotworzenia.



Rycina 3 Czynniki stymulujące i hamujące syntezę i wydzielanie hepcydyny. [1] Ganz, T., *Systemic iron homeostasis*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(4): p. 1721-41.

1.1.3. Mechanizmy wewnątrzkomórkowe homeostazy żelaza

Podobnie jak równowaga ogólnoustrojowa żelaza istotna jest jego homeostaza wewnątrzkomórkowa, zapewniająca prawidłowe funkcjonowanie komórki i ochronę przed szkodliwym, toksycznym działaniem wolnego pierwiastka. Również tam wytworzyły się mechanizmy regulujące syntezę poszczególnych białek zaangażowanych w procesy metaboliczne związane z żelazem. Regulacja wewnątrzkomórkowa jest najprawdopodobniej sprzężona z systemową, zależną od hepcydyny. [5]

Prawidłowy przepływ żelaza zapewniający jego homeostazę komórkową oparty jest na systemie białek IRP 1, 2 (iron regulatory protein 1, 2), które w warunkach niskiego stężenia żelaza wiążą się z wyspecjalizowanymi regionami IRE (iron regulatory element) mRNA białek zaangażowanych w metabolizm żelaza, zlokalizowanymi na końcu 5' lub 3'łańcucha. Wiązanie z końcem 5' powoduje hamowanie translacji a co za tym idzie syntezy białek odpowiedzialnych za wiązanie jonu i jego ucieczkę z komórki (mechanizm

charakterystyczny np. dla ferrytyny, ferroportyny]. Połączenie z końcem 3' mRNA stabilizuje łańcuch chroniąc go przed działaniem endonukleaz, co z kolei powoduje wzrost procesów syntetycznych białek odpowiedzialnych za zwiększenie napływu żelaza (np. DMT1). Istnieją różnice tkankowe w obecności rejonów IRE poszczególnych białek, co w kluczowych tkankach powoduje uniezależnienie transportu żelaza od jego stężenia, np. w prekursorach erytropoezy.

1.2. Udział żelaza w procesach metabolicznych i immunologicznych

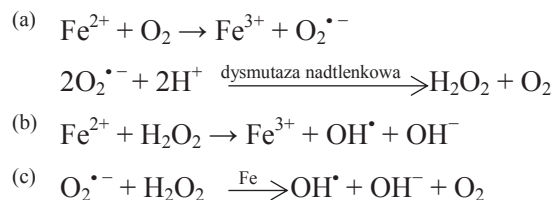
Szerokie rozpowszechnienie żelaza w świecie ożywionym i subtelna regulacja w utrzymaniu jego homeostazy związana jest z udziałem pierwiastka w wielu procesach kluczowych dla przeżycia komórek i tkanek.

Podstawową funkcją żelaza w ustroju człowieka jest udział w transporcie i magazynowaniu tkankowym tlenu oraz wytwarzanie energii koniecznej w procesach metabolicznych. Poza procesami energetycznymi właściwości żelaza są wykorzystywane w procesach replikacyjnych i regulacyjnych komórki, gdyż centrum aktywne wielu enzymów cytosolowych i jądrowych oparte jest o prostetyczne grupy zawierające żelazo. [9, 10]

1.2.1. Wpływ żelaza na czynność układu immunologicznego

Tkanki i komórki układu immunologicznego podlegają opisanym wyżej regulacjom zależnym od żelaza. Od wczesnych lat 90 dwudziestego wieku prowadzono badania wyjaśniające wzajemne zależności między wpływem układu odpornościowego na homeostazę żelaza ustroju oraz rolę tego pierwiastka w procesach obrony immunologicznej.

Homeostaza żelazowa i biologia nieswoistej odpowiedzi immunologicznej są ściśle ze sobą powiązane. Po aktywacji przez czynniki infekcyjne licznych receptorów komórek układu wrodzonej odporności (makrofagów i granulocytów), do zwalczania patogenów wykorzystywane są metaloproteinazy oraz inne enzymy z grupami prostetycznymi. Przykładem może być mieloperoksydaza granulocytowa odpowiedzialna za powstanie kwasu podchlorawego [o właściwościach bakterio – i wirusobójczych], który w obecności żelaza generuje rodniki hydroksylowe. Inną właściwością biochemiczną żelaza wpływającą na czynność układu immunologicznego jest zdolność do reakcji oksydoredukcyjnych. W obecności reaktywnych rodników tlenowych powstających przy udziale oksydazy NADPH fagolizosomów, żelazo zdolne jest do generowania hydroksylowych rodników w reakcji Fentona i Habera-Weissa. Wywołany w ten sposób stres oksydacyjny wykorzystywany jest przez komórki immunologiczne do destrukcji lipidów, białek i DNA, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórkowej patogenu. [11, 12]



Rycina 4 Reakcja Fentona (b) i Habera – Weissa (c)

Wiele komórek wykorzystuje efekt przeciwbakteryjny wyjątkowo toksycznych rodników azotowych, powstających z tlenku azotu (NO) przy udziale syntetazy iNOS (syntetaza tlenku azotu), regulowanej stężeniem wolnego żelaza komórkowego. W przypadku wysokiego stężenia wolnego pierwiastka aktywność enzymatyczna iNOS ulega redukcji, co może mieć wpływ na obronę przeciwbakteryjną. [13]

Najważniejszą, jak się wydaje, zdolnością wrodzonego układu immunologicznego w zwalczaniu patogenów infekcyjnych jest współzawodniczenie o dostępność żelaza ustrojowego, jako niezbędnego pierwiastka śladowego dla procesów biologicznych. W tym aspekcie mówi się o odporności zależnej od odżywiania („nutrition immunity”). W każdym przypadku, zarówno zakażenia patogenami zewnątrzkomórkowymi jak i wewnątrzkomórkowymi, aktywowane są mechanizmy obniżające stężenie żelaza w odpowiednim kompartmentcie. Jednym z takich mechanizmów jest towarzysząca procesom zapalnym nasilona produkcja laktoferyny i jej wydzielanie na powierzchni błon śluzowych oraz uwalnianie z ziarnistości wtórnych granulocytów. Glikoproteina ta jest podobna strukturalnie do transferyny, jednak charakteryzuje się znacznie większą zdolnością wiązania żelaza szczególnie w kwaśnym środowisku ogniska zakażenia.[14] Niski poziom żelaza potęguje wpływ hepcydyny (białka pierwotnie identyfikowanego z moczu i surowicy podczas procesu zapalnego, określanego jako białko przeciwbakteryjne)[15] wydzielanej pod wpływem cytokin prozapalnych i

aktywacji receptorów makrofagowych TLR (toll like receptor). Stwierdzono również syntezę hepcydyny lokalnie, w miejscu procesu zapalnego, przez makrofagi i neutrofile pod wpływem antygenów infekcyjnych. Ten proces może być odpowiedzialny za miejscowe obniżenie stężenia żelaza. [16] Cytokiny mogą wpływać również na stężenie żelaza poprzez mechanizmy niezwiązane z hepcydyną np. takie jak hamowanie DMT1 przez TNF α , czy feroportyny przez INF γ .

Wrodzone mechanizmy immunologiczne wpływają podobnie na dostępność żelaza w przypadku zakażenia patogenami wewnątrzkomórkowymi. Cytokiny prozapalne powodują przesunięcie żelaza z fagolizosomów, endosomów i cytosolu, które często są miejscem namnażania patogenów, do wiązań z ferrytyną lub pozakomórkowo. INF γ hamuje receptor transferryny TFR uniemożliwiając pobór żelaza przez zainfekowane komórki, z drugiej strony wraz z TNF α czy IL - 1 powoduje wypływ pierwiastka przez receptory fagolizosomów makrofagowych Nramp1.

Pozyskiwanie żelaza (w formie wolnej i związanej z hemem czy innymi białkami – hemoglobina, transferyną, laktoferyną) przez organizmy infekcyjne jest miarą ich patogenności. Wytworzyły one szereg mechanizmów omijających układ odpornościowy ograniczający dostępność pierwiastka. Przykładem może być wytworzenie przez bakterie syderoforów, białek chelatujących żelazo ze zdolnością wiązania znacznie przewyższającą zdolność wiązania transferryny, co pozwala efektywnie współzawodniczyć o dostępność tego podstawowego mikroelementu. Z drugiej strony komórki odporności wrodzonej wytwarzają siderokalinę (lipocalinę 2) mogącą neutralizować syderofory. [17]

Wpływ żelaza na procesy nabytej odpowiedzi immunologicznej pozostaje niejednoznaczny. Jak w każdej tkance pierwiastek ten odpowiedzialny jest za prawidłowy przebieg proliferacji komórek jak i ich dojrzewanie stanowiąc o prawidłowej funkcji układu immunologicznego. Istnieją doniesienia wskazujące na obniżenie ilości limfocytów T lub zaburzenia stosunku ilościowego

subpopulacji limfocytów CD4⁺/CD8⁺ w przypadku niedoboru żelaza.[18, 19] W ostatnim czasie podjęto ocenę funkcji limfocytów T regulatorowych i Th17. Badania te zostały przeprowadzone jedynie na modelu zwierzęcym, wskazują jednak na zaburzoną ich ilość i aktywność sprzyjającą procesom autoagresji. [20]

1.3. Stany przeładowania żelazem

1.3.1. Wiadomości ogólne.

Ze względu na potencjalną toksyczność żelaza, pierwiastek ten w formie wolnej występuje w organizmie jedynie w śladowych ilościach. Patologie prowadzące do przeładowania kationem, powodują ostatecznie dysfunkcję i uszkodzenie tkanek, w których akumulacja ma miejsce.

| Stany przeładowania żelazem | |
|--|--|
| niski poziom hepcydyny | prawidłowe wydzielanie hepcydyny |
| Wrodzone | |
| hemochromatoza | mutacje ferroportyny |
| mutacja HAMP1 | nieklasyczna postać choroby ferroportyny |
| mutacje genu HFE | aceruloplazminemia |
| mutacje genu TFR2 | atransferynemia |
| mutacje HJV | niedobór DMT-1 |
| | anemia sideroblastyczna związana z chromosomem X |
| | Friedreich ataksja |
| | beta - talasemia |
| Nabyte | |
| przewlekłe choroby wątroby | anemia chorób przewlekłych |
| poalkoholowe uszkodzenie wątroby | wtórna, potransfuzyjna hemochromatoza |
| niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby | |
| wirusowe zapalenie wątroby | |
| niewydolność wątroby | |
| noworodkowa hemochromatoza | |

Tabela 1 Stany przeładowania żelazem. [21, 22]

Najlepiej poznany schorzeniem prowadzącym do spichrzania żelaza jest uwarunkowana genetycznie hemochromatoza spowodowana homozygotyczną mutacją genu HFE.[23] Patomechanizmem prowadzącym do zaburzeń homeostazy żelazowej jest nieprawidłowe wydzielanie lub oporność na hepcydynę, powodujące nieograniczoną podaż żelaza jelitowego przy niezmiennym wydalaniu i jego akumulację w tkankach parenchymalnych, poza naturalnymi magazynami.

Nieco innym mechanizmem odkładania nadmiaru żelaza charakteryzują się najczęstsze zaburzenia nabyte: potransfuzyjna hemosyderoza oraz niedokrwistość chorób przewlekłych. Z uwagi na niezmienną regulację hepcydyny stany te związane są z prawidłowym lub wysokim stężeniem hormonu i akumulacją pierwiastka głównie w makrofagach wątrobowych i śledzionowych.

1.3.2. Rola ferrytyny

Głównym białkiem biorącym bezpośredni udział w magazynowaniu żelaza jest ferrytyna, sferyczna proteina zbudowana z 24 jednostek polipeptydowych. Składa się ona z łańcuchów ciężkich wykazujących aktywność enzymatyczną ferooksydazy, co pozwala na zmianę stanu elektronowego żelaza. Taki pierwiastek może następnie zostać przyłączony do aminokwasów łańcuchów lekkich, z którymi tworzy wewnętrzne jądro krystaliczne atomów magazynowanych w tej formie. Ferrytyna stanowi główne białko cytosolowe odpowiedzialne za regulację wolnego żelaza niezbędnego do procesów biochemicznych komórki. Bierze udział w ochronie struktur komórkowych przed procesami oksydoredukcyjnymi związanymi z obecnością żelaza niezwiązanego. Część białka zlokalizowana jest dodatkowo w mitochondriach stanowiąc podobną ochronę jak w cytosolu. W warunkach zdrowia stężenie tego białka w surowicy stanowi odzwierciedlenie zapasów komórkowych żelaza ustrojowego. Rola ferrytyny pozakomórkowej jest prawdopodobnie bardziej złożona. W procesach ostrej fazy, w okresie zapalenia i stresu oksydacyjnego, jej stężenie może ulec znacznemu zwiększeniu, co ma na celu redukcję wolnego żelaza dostępnego dla patogenu oraz ochronę organizmu przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników powstających przy jego udziale. Nowsze badania wskazują dodatkowe funkcje ferrytyny takie jak: dostarczanie żelaza komórkowego, supresja makrofagów, limfocytów i prekursorów linii

mieloidalnej, a zdolność wiązania z innymi białkami osocзовymi takimi jak fibrynogen, kininogen wielkocząsteczkowy czy α_2 makroglobulina może mieć potencjalne działanie angiogenne. [24, 25]

W warunkach patologicznego nadmiaru żelaza, po przekroczeniu puli wiązania transferyny i ferrytyny, pierwiastek gromadzony jest w postaci niezwiązanej z białkami – NTBI. To labilne połączenie, prawdopodobnie z albuminami i kwasami organicznymi jest akumulowane w tkankach głównie wątroby [poza układem siateczkowo –śródbłonkowym], serca, gruczołów endokrynych, trzustki i stawów. Niezwiązane z ferrytyną i transferyną żelazo, poprzez właściwości oksydoredukcyjne powoduje uszkodzenie poszczególnych organów prowadząc ostatecznie do zaburzeń strukturalnych i niewydolności.

1.3.3. Zakażenia w stanach przeładowania żelazem.

Wzajemne oddziaływanie układu odpornościowego i zasobów żelaza może być podłożem zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego zarówno w przypadku niedoboru i nadmiaru żelaza. [26] Choć przeprowadzone do tej pory badania obserwacyjne jak i badania na zwierzętach nie są jednoznaczne [27], to wskazują, iż w obu stanach może dochodzić do większej podatności na infekcje.

Stany przeładowania żelazem ze wzrostem dostępności pierwiastka dla patogenów inwazyjnych powodują większą chorobowość i śmiertelność infekcyjną.[28] Najwięcej danych związanych ze stanem przeładowania organizmu żelazem dotyczyło zakażeń patogenem wewnątrzkomórkowym – malarią. [29] W przypadku tej infekcji zwiększona podaż żelaza poprzez suplementację, jak również stan przeładowania żelazem związany z niskim stężeniem hepcydyny zwiększa prawdopodobieństwo oraz ciężkość infekcji.

Podobne obserwacje dotyczą patogenów wewnątrzkomórkowych, których główną niszą są komórki makrofagowe – *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* i *Leishmania amezonensis* oraz *Legionella*, *Chlamydia*, *Salmonella enterica typhimurium*. [30] Zwiększenie stężenia żelaza w makrofagach poprzez zwiększone stężenie hepcydyny predysponuje do rozwoju zakażenia, natomiast przeładowanie parenchymalne żelazem chroni przed rozwojem gruźlicy. W przypadku *Mycobacterium avium*, w badaniach *in vitro* stwierdzono, iż chorzy z hemochromatozą typu I rozwijają zwiększoną ilość bakterii w tkankach poza układem siateczkowo-śródbłonkowym.

Pacjenci z najczęstszą postacią hemochromatozy wrodzonej wykazują zwiększoną skłonność do zakażeń bakteriami siderofilnymi: *Vibrio*, *Yersenia*, *Salmonella*, *Escherichia*. [11, 12, 30] W badaniach na zwierzętach, u myszy z niedoborem hepcydyny, stwierdzono również zwiększoną śmiertelność w przypadku sepsy czy stymulacji LPS. [31, 32]

Jednym z najcięższych zakażeń, głównie dotyczących chorych z niedoborem odporności, są zakażenia grzybicze. Wytworzenie mechanizmów pozyskujących żelazo przez te patogeny warunkuje ich zjadliwość i umożliwia inwazję. Stwierdzono, iż wzrost stężenia żelaza jest jednym z czynników ryzyka inwazyjnej grzybicy w przypadku zakażeń grzybami z rodziny *Mucoraceae* i *Aspergillus*. Natomiast leczenie deferoksaminą, cząsteczką chelatującą żelazo pochodzenia bakteryjnego, paradoksalnie zwiększa ryzyko ciężkiego zakażenia mucormycozą z uwagi na możliwość wykorzystania ksenofobicznego sideroforów przez patogen inwazyjny. [33, 34]

1.4. Alotransplantacja komórek krwiotwórczych

1.4.1. *Wiadomości ogólne*

Leczenie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego oparte jest o techniki chemio- bądź radioterapii. Jednak mimo coraz większego spektrum dostępnych leków standardowe metody wciąż nie pozwalają uzyskać wystarczająco wysokich wskaźników wyleczenia w wielu jednostkach chorobowych. Transplantacja hematopoetycznych komórek progenitorowych (hematopoietic stem cell transplantation – HSCT), pozwala na stosowanie chemio-radioterapii w dawkach mieloablacyjnych umożliwiających redukcję minimalnej choroby resztkowej. W przeszczepieniach alogenicznych (allogeneic stem cell transplantation – aloSCT) efekt ten pogłębia reakcja przeszczep przeciwko białaczce (graft versus leukemia – GvL). AloSCT jest uznaną, zwykle jedyną metodą terapii pozwalającą uzyskać trwałe wyleczenie wielu schorzeń układu krwiotwórczego i immunologicznego. Mimo ogromnego postępu wiedzy jest jednak nadal obciążona istotną śmiertelnością niezależną od wznowy 15-40%. [134] Ze względu na wpływ żelaza na wiele aspektów biologii komórkowej i całego organizmu, jednym z potencjalnych czynników ryzyka powikłań przeszczepowych może być dysregulacja gospodarki żelaza. Dotychczasowe analizy tego aspektu procedury transplantacyjnej nie są jednoznaczne, zarówno pod względem metodyki badań, jak i rzeczywistego wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej na przebieg i występowanie powikłań przeszczepienia. [35-39]

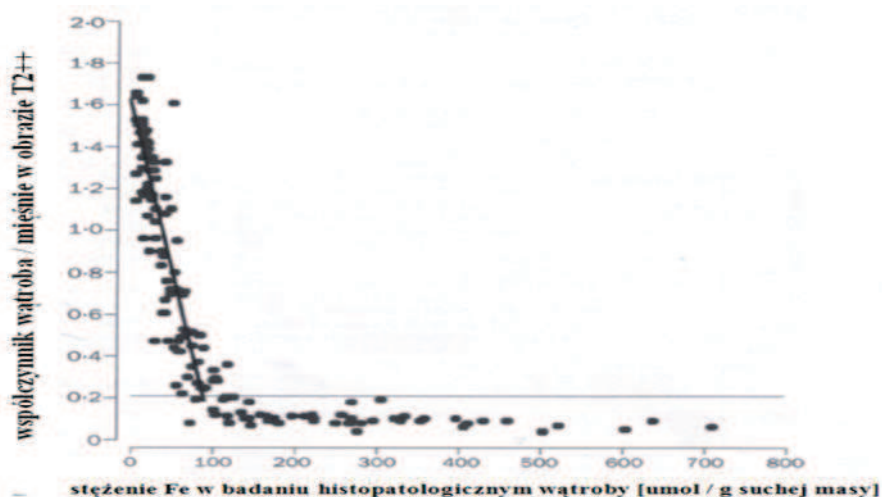
1.4.2. Zaburzenia gospodarki żelazowej u pacjentów poddanych alotransplantacji

Chorzy poddawani alotransplantacji hematopoetycznych komórek progenitorowych, w większości przypadków wymagają wcześniej intensywnej terapii z koniecznością licznych przetoczeń składników krwi. Z tego powodu mogą być narażeni przed i podczas całej procedury transplantacyjnej na istotne zaburzenia gospodarki żelaza, wynikające głównie z przeładowania organizmu pierwiastkiem. Podstawowym czynnikiem sprzyjającym jego nadmiernemu gromadzeniu są liczne transfuzje koncentratu krwinek czerwonych (KKCz). Szacuje się, iż jedna jednostka KKCz zawiera 200-250 mg żelaza. Drugim czynnikiem wpływającym na nadmierne gromadzenie pierwiastka może być aktywna, choć nieefektywna erytropoeza z towarzyszącą hemolizą, aktywująca reabsorpcje jelitową żelaza. Patologia ta dotyczy chorych z zespołami mielodysplastycznymi, a po przeszczepieniu występuje w okresie potencjalnej zmiany grupy krwi. Pula wolnego żelaza wzrasta przejściowo także po zastosowaniu postępowania przygotowawczego (kondycjonowanie) przebiegającego z uszkodzeniem hepatocytów, makrofagów, erytrocytów i ich prekursorów uwalniających żelazo z przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Przejściowe zaburzenia syntezy transferryny (w mniejszym stopniu ferrytyny) mogą być przyczyną dużej koncentracji wolnej puli żelaza (NTBI).

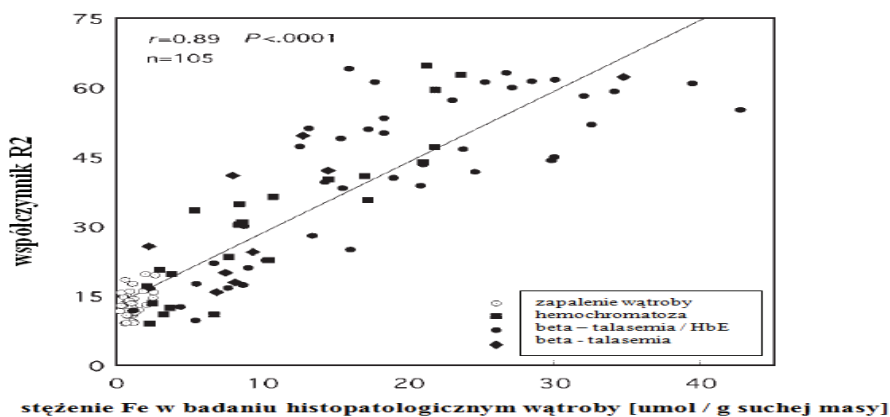
1.4.3. Metody oceny zasobów żelaza ogólnoustrojowego i tkankowego

Ocena gospodarki żelazowej oparta jest o badanie stężenia pierwiastka w surowicy i oznaczenia stężeń podstawowych białek biorących udział w homeostazie żelaza: ferrytyny, transferryny i jej wysycenia żelazem (saturacji).

Parametry te dobrze odzwierciedlają pulę żelaza w organizmie w warunkach zdrowia. W stanach zaburzenia homeostazy wiele czynników może wpływać na ich wartości np.: ferrytyna stanowi białko późnej ostrej fazy, a transferyna należy do nielicznej grupy ujemnych białek procesu zapalnego. Ponadto stężenie transferyny zmienia się znacząco pod wpływem nasilonego katabolizmu i niedożywienia. Dlatego poszukiwano innych metod (poza biopsją wątroby) zwykle niemożliwą do przeprowadzenia u chorych poddawanych ałoSCT], które pozwalałyby ocenić gromadzenie żelaza w tkankach w sposób nieinwazyjny i obiektywny. Szczególnie użyteczne wydają się tu być techniki oferowane w badaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI). [40-44] Obrazowanie rezonansu magnetycznego jest bezpieczną, nieinwazyjną, pośrednią metodą oceny zasobów żelaza, w której wykorzystywane są właściwości paramagnetyczne żelaza dyssynchronizujące oceniane protony cząsteczek wody gromadzonej wokół depozytów pierwiastka. Kilka sekwencji okazało się przydatnych w ocenie spichrzania żelaza w badaniach chorych z wrodzonymi zaburzeniami erytropoezy. Wyniki obrazowania MRI korelowały ze stężeniem żelaza w wątrobie (LIC – liver iron capacity) uzyskiwanym w badaniu histopatologicznym tkanki wątrobowej. Pierwszą z technik była metoda opisana przez Y. Gandona [45] porównująca sygnał uzyskany w wątrobie w stosunku do sygnału mięśni przykręgosłupowych. Podobną korelację uzyskał w badaniach T. St. Pierre [46] i Wood J. [42], którzy wykorzystywali sekwencje spinu echa (obrazy T2 zależne w ms) lub gradientu echa (obrazy T2* w ms) i zaproponowali współczynniki R2 i R2* odpowiednio wyrażone jako $1000/T2$ lub $1000/T2^*$ (w s^{-1} lub Hz). Nieliczne prace poświęcone zostały zastosowaniu metody oceny MRI u chorych poddanych ałoSCT. [47]



Rycina 5 Zależność współczynnika sygnału wątroba/mięśnie w zależności od stężenia żelaza w g suchej masy tkanki wątrobowej w badaniu histopatologicznym.[45] „Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI” Gandon Y. Lancete 2004.



Rycina 6 Zależność współczynnika sygnału R2 w zależności od stężenia żelaza w g suchej masy tkanki wątrobowej w badaniu histopatologicznym. [46] „Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance.” G. St. Pierre T. Transfusion medicine 2005.

1.4.4. Powikłania transplantacyjne a zaburzenia homeostazy żelaza

Alotransplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych jest leczeniem trudnym i obarczona istotnym ryzykiem licznych powikłań.

Bezpośrednim efektem zamierzonego, aczkolwiek niekorzystnego działania chemioterapii i radioterapii kondycjonującej jest uszkodzenie komórek macierzystych narządów szybko regenerujących, co doprowadza do toksyczności narządowej, w tym najczęściej: chemicznego uszkodzenia błon śluzowych (mucositis), pancytopenii w wyniku działania mieloablacyjnego, toksyczności wątrobowej, czy uszkodzenia śródbłonnków naczyń krwionośnych. Ostatnie z wymienionych zaburzeń jest głównym mechanizmem patogenetycznym grupy specyficznych dla aloSCT powikłań nieinfekcyjnych, często nakładających się na siebie i trudnych do różnicowania. Należą tu zespoły: przebiegania włósniczkowego i wszczepienia, rozsiane krwawienie pęcherzykowe, idiopatyczne zapalenie płuc, zespół wielonarządowej niewydolności, mikroangiopatia związana z transplantacją (transplanted microangiopathy – TAM), czy choroba wenookluzyjna wątroby (veno-occlusive disease -VOD, sinusoidal obstruction syndrome – SOS). SOS jest jedną z najlepiej zdefiniowanych mikroangiopatii związanych z aloSCT, do rozpoznania której niezbędne jest spełnienie kryteriów Saette lub Baltimore.[48-51] Etiologia i patofizjologia procesu nie została do końca poznana. Wiadomo, iż pod wpływem licznych czynników uszkadzających dochodzi do zaniku fenestracji komórek endotelium, następnie obrzęku, złuszczenia i ostatecznie zamknięcia światła sinusoidy, w którym udział mają również inne komórki krwi i proces wykrzepiania. Uszkodzeniu ulegają także hepatocyty centrolobularne. Istnieje szereg udowodnionych czynników predysponujących do rozwoju SOS (leki, rodzaj kondycjonowania, rodzaj dawcy, czy współwystępowanie infekcji]. Żelazo poprzez swoje właściwości oksydoredukcyjne, toksyczne dla tkanek, może być dodatkowym czynnikiem predysponującym do rozwoju uszkodzenia hepatocytów

do ostatecznego wystąpienia SOS, szczególnie w przypadku przeładowania żelazem i pojawienia się pierwiastka w formie wolnej.[50, 52-54]

Kolejnym rodzajem powikłań często występujących w okresie aplazji i zaburzeń hematopoezy, a następnie leczenia immunosupresyjnego są powikłania infekcyjne, niejednokrotnie atypowe i oportunistyczne. Czas pojawienia się infekcji bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych i pasożytniczych jest związany z poszczególnymi okresami allotransplantacji. Mimo leczenia profilaktycznego oraz preemptywnego powikłania infekcyjne nadal stanowią istotny wczesny i późny problem procedury odpowiedzialny za śmiertelność związaną z transplantacją. Biorąc pod uwagę opisany wcześniej wpływ żelaza na regulację i funkcję układu immunologicznego oraz promocję rozwoju patogenów siderofilnych, stany przeładowania tym pierwiastkiem mogą być dodatkowym obciążeniem w procesie transplantacji.

Podobne obserwacje dotyczą kolejnego powikłania aloSCT, występującego już w okresie rekonstrukcji układu immunologicznego, choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft versus host disease – GvHD), występującej w postaci ostrej (aGvHD) oraz przewlekłej (cGvHD). Szczególnie patomechanizmy aGvHD mogą być nasilane przez toksyczne uszkodzenie tkanek związane z akumulacją żelaza. Patogeneza procesu związana jest, bowiem z aktywacją komórek prezentujących antygen (antygen presenting cells – APC) przez cytokiny uwolnione w wyniku uszkodzenia narządów i stymulacji prozapalnej.[55-57] Dodatkowym czynnikiem stymulującym jest reakcja zapalna nasilana w wyniku procesów infekcyjnych występujących w tym okresie. Aktywacja APCs doprowadza do stymulacji i odpowiedzi cytotoksycznej limfocytów dawcy ulegających proliferacji i różnicowaniu w okresie regeneracji. Bezpośrednie działanie cytotoksyczne w przebiegu aGvHD wywierają limfocyty T cytotoksyczne (Tc i NK (natural killers)). [55] Z nieco innymi mechanizmami związana jest przewlekła postać GvHD, gdzie kluczową rolę odgrywa zaburzona kontrola alo- i autoreaktywnych limfocytów zarówno T jak i B, doprowadzająca

do przewlekłego procesu autoagresji. Również tu zaburzenie rekonstytucji i równowagi między subpopulacjami limfocytów pod wpływem zaburzeń gospodarki żelaza może mieć potencjalny wpływ na rozwój i ciężkość tego powikłania. [55, 56, 58]

2. ZAŁOŻENIA I CEL BADAŃ

Metodyka badań stanów przeciążenia żelazem uwzględnia najczęściej ocenę zasobów tego pierwiastka poprzez oznaczenie stężenia ferrytyny. Ze względu na liczne wpływy, jakim podlega to stężenie i jego zmiany w zależności od procesów zapalnych metoda ta może nie być adekwatna do oceny rzeczywistych, ogólnoustrojowych oraz tkankowych zasobów żelaza. Dotychczasowe wyniki badania wpływu przeładowania żelazem na powikłania transplantacyjne nie są jednoznaczne. W niewielkim stopniu uwzględniają również wpływ na ilość i jakość powikłań infekcyjnych. Założeniem pracy była próba zobiektywizowania stanu zasobów żelazowych w organizmie pacjentów poddanych ałoSCT poprzez wykorzystanie nowoczesnych narzędzi w badaniu metodą rezonansu magnetycznego i odniesienie tego parametru do zanotowanych powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych.

Jako cele pracy postawiono:

1. Ocenę użyteczności metody obrazowania MRI w wykrywaniu stopnia przeładowania żelazem organizmu w porównaniu z klasyczną oceną biochemiczną przy pomocy ferrytyny u chorych poddanych alogenicznemu przeszczepieniu komórek macierzystych krwiotworzenia.
2. Ocenę wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej i spichrzenia żelaza na częstość występowania i ciężkość powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych u chorych we wczesnym okresie po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych.

3. Ocenę wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej na częstość i stopień ciężkości ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi u chorych po alogeniczej transplantacji hematopoetycznych komórek progenitorowych.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Protokół badania

Grupę badaną stanowiło 45 chorych w wieku powyżej 18 lat poddanych aloSCT w Klinice Hematologii i Transplantologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (UCK) w latach 2015 -2016 z powodu schorzeń układu krwiotwórczego.

Kryteria włączenia chorych poddanych obserwacji

Wiek powyżej 18 lat.

Rozpoznanie choroby układu krwiotwórczego kwalifikującej do ałotransplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych.

Uzyskanie świadomej, pisemnej zgody pacjenta na udział w badaniu i przetwarzanie danych osobowych oraz na dodatkowe obrazowanie MRI wątroby w ramach oceny przebiegu transplantacji i ewentualnych powikłań leczenia.

Kryteria wyłączenia chorych poddanych obserwacji

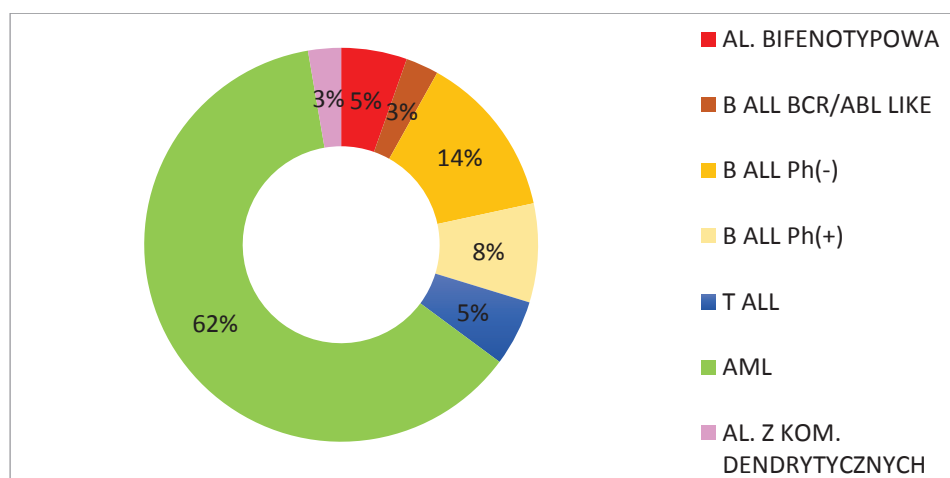
Niewyrażenie zgody przez chorego na gromadzenie danych z przeprowadzonych rutynowo badań diagnostycznych.

Przeciwwskazania medyczne do wykonania MRI.

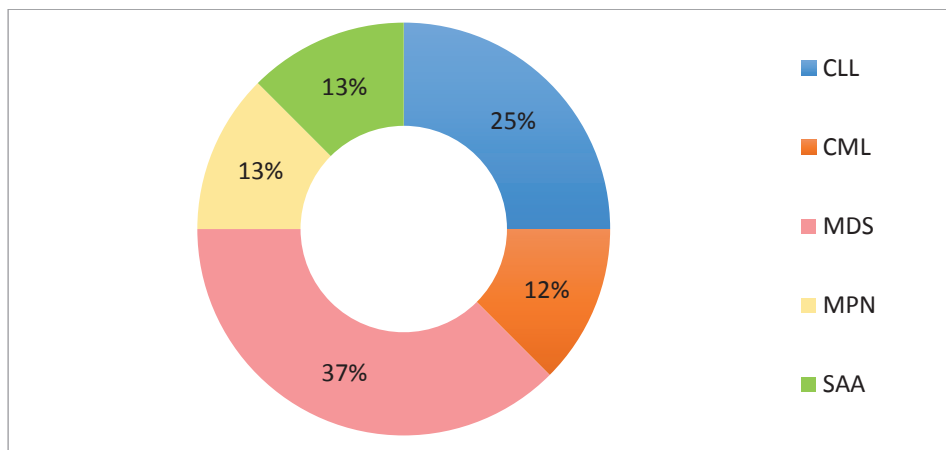
3.2. Charakterystyka grupy pacjentów

Obserwację i analizę danych klinicznych przeprowadzono u 45 pacjentów z rozpoznaniem choroby hematologicznej kwalifikującej do ałoSCT.

Większość chorych stanowiły osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki. Szczegółowe podtypy ostrej białaczki przedstawiono na wykresie 1. U pozostałych pacjentów stwierdzono inne choroby rozrostowe układu krwiotwórczego takie jak: przewlekła białaczka szpikowa, niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjny, zespół mielodysplastyczny, przewlekła białaczka limfocytowa. Jedna osoba została poddana transplantacji z powodu nabytej ciężkiej postaci niedokrwistości aplastycznej. Dane odsetkowe dla poszczególnych rozpoznań innych niż ostra białaczka przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 7 Szczegółowe rozpoznania wśród pacjentów poddanych analizie z diagnozą ostrej białaczki. (AL – ostra białaczka, ALL – ostra białaczka limfoblastyczna, AML – ostra białaczka szpikowa).



Rycina 8 Szczegółowe rozpoznania wśród pacjentów poddanych analizie z diagnozą inną niż ostra białaczka (CLL – przewlekła białaczka limfocytowa, CML – przewlekła białaczka szpikowa, MDS – zespół mielodysplastyczny, MPN – przewlekły nowotwór mieloproliferacyjny, SAA – anemia aplastyczna)

Mężczyźni i kobiety stanowili odpowiednio 58,7% i 41,3%. Przed wykonaniem aloSCT 42 osoby (93%) zostały poddane standardowemu leczeniu chemioterapią. Mediana ilości cykli chemioterapii wynosiła 4 z zakresem od 2 do 31. 2 osoby (4%) otrzymały dodatkowo radioterapię uzupełniającą. Pozostali chorzy (3 osoby, 7%) byli poddani innemu leczeniu choroby zasadniczej (tymoglobulina, inhibitory kinazy tyrozynowej). 89% pacjentów uzyskało odpowiedź na leczenie, w tym 84% chorych uzyskało całkowitą remisję hematologiczną.

Dane demograficzne grupy badanej, rozpoznania kliniczne oraz status choroby zasadniczej w chwili transplantacji przedstawiono w tabeli 2.

| dane podstawowe | kobiety | mężczyźni | razem | P |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------|
| liczba chorych | 18 | 27 | 45 | |
| w momencie rozpoznania | | | | |
| wiek (lata) | 43,7 (12,5) | 42,1 (13,9) | 42,7 (13,3) | NS |
| diagnoza: | | | | |
| ostra białaczka | 12 | 25 | 37 | p<0,025 |
| inne | 6 | 2 | 8 | |
| w momencie przeszczepienia | | | | |
| czas od rozpoznania (miesiące) | 17,9 (7,0-238,2) | 9,3 (5,7 - 88,9) | 9,8 (5,7 - 238,2) | NS |
| czas od rozpoznania* (miesiące) | 17,5 (7,0-157,5) | 9,3 (5,7 - 88,9) | 9,6 (5,7 - 157,5) | NS |
| status choroby | | | | |
| całkowita remisja - pierwsza | 8 | 22 | 30 | p<0,002 |
| całkowita remisja - kolejna | 3 | 5 | 8 | |
| bez remisji | 7 | 0 | 7 | |

Tabela 2 Dane demograficzne 45 pacjentów poddanych analizie. * Dane po wykluczeniu z analizy chorej ze skrajnie odbiegającym od średniej okresem od rozpoznania do transplantacji.

Alotransplantacja hematopoetycznych komórek progenitorowych została przeprowadzona według standardowych procedur obowiązujących w ośrodku. Dane dotyczące kondycjonowania, rodzaju dawcy oraz rodzaju przeszczepu przedstawiono w tabeli 3.

| opis przeszczepienia | kobiety | mężczyźni | razem | p |
|--|---------|-----------|-------|-----------|
| kondycjonowanie | | | | |
| mieloablacyjne | 11 | 25 | 36 | p < 0,027 |
| niemieloablacyjne | 2 | 7 | 9 | |
| rodzaj dawcy | | | | |
| spokrewniony | 7 | 14 | 21 | NS |
| niespokrewniony | 10 | 9 | 19 | |
| niespokrewniony nie w pełni zgodny w HLA | 1 | 4 | 5 | |
| przeszczep | | | | |
| krew obwodowa | 17 | 27 | 44 | NS |
| szpik | 1 | 0 | 1 | |

Tabela 3 Dane schematu procedury aloSCT 45 pacjentów poddanych analizie.

3.3. Opis stosowanych metod badawczych, materiał badany

3.3.1. Ocena stopnia przeładowania żelazem

3.3.1.1. Pośrednia ocena żelaza ustrojowego za pośrednictwem ferrytyny.

Ocenę gospodarki żelazowej i stopnia przeładowania organizmu żelazem oceniano pośrednio poprzez oznaczenie stężenia ferrytyny w surowicy krwi. Materiał pobierano u wszystkich chorych z badanej grupy według wytycznych standardowej opieki podczas rutynowych wizyt u chorych przygotowywanych do aloSCT w okresie nie dłuższym niż 30 dni przed zabiegiem oraz w 30 dobie po wykonaniu procedury. Badanie wykonywane było w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (CLK UCK) z próbki krwi w ilości 3 ml pobranej do probówki bez antykoagulantu zgodnie ze standardami laboratoryjnymi właściwymi dla testu. W ocenie uzyskanych wyników posługiwano się normami obowiązującymi w CLK UCK: 21,81 – 274,66 ng/ml.

3.3.1.2. Ocena stężenia żelaza metodą rezonans magnetycznego [MRI].

Metodą oceny zawartości żelaza w wątrobie (liver iron concentration – LIC) skorelowanej ze stopniem ogólnoustrojowego przeładowania żelazem było oznaczenie spichrzenia pierwiastka w badaniu wątroby metodą rezonansu magnetycznego. Badaniu poddano 45 chorych, o różnym stopniu narażenia na gromadzenie żelaza, po 30 dobie aloSCT. Procedurę wykonano u chorych po uzyskaniu pisemnej zgody, u których nie istniały przeciwwskazania medyczne. Badanie przeprowadzono bez podania środka kontrastowego. Obrazowanie przeprowadzono w II Zakładzie Radiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego aparatem Simens Magnetom AERA 1,5 T.

U jednego chorego z powodu błędu technicznego badanie nie zostało poddane ocenie.

Wykonano ocenę narządów jamy brzusznej w obrazach T1 – i T2 – zależnych, z saturacją tkanki tłuszczowej, z sekwencją DWI (diffusion-weighted imaging) oraz Dixon. Do oceny spichrzenia żelaza przeprowadzono badanie w następujących sekwencjach:

Sekwencja Gandona

Badania wykonano według standardowej procedury [59] w sekwencjach T1, T2, PD (proton density), T2+, T2++. Ustalono reprezentatywną tkankę wątroby nieobejmującą dużych naczyń krwionośnych oraz tkankę mięśni przykręgosłupowych celem wyznaczenia rejonów zainteresowania (region of interest – ROI), w których dokonano pomiaru siły sygnału (SI). Poszczególne dane posłużyły do wyliczenia SI (według krzywej wzorcowej) odpowiadającemu stężeniu żelaza w badaniu histopatologicznym wątroby (umol/g suchej masy) zgodnie z kalkulatorem metody badawczej Gandona dostępnej pod adresem strony internetowej:

<http://www.radio.univ-rennes1.fr/Sources/EN/HemoCalc15.html>

Rycina 9 Kalkulator medyczny on-line – żelazo, wątroba i MRI. Yves Gandon.

Sekwencje multiechowe (14 ech).

Badanie przeprowadzono zgodnie z opisem w literaturze w sekwencji multiechowej przy użyciu 14 ech. Intensywność sygnału oceniono ze średniej intensywności 5 ROI w reprezentatywnych miejscach miąższu wątroby z ominięciem dużych naczyń krwionośnych. Każdorazowo wybierano podobne obszary wątroby. Intensywność sygnału oceniono w obrazach gradientu echa

(GRE) T2* ms oraz obrazach współczynnika $R2^* = 1000/T2^*$ s⁻¹ albo Hz, które korelują ze stężeniem żelaza w badaniu histopatologicznym wątroby mg / g suchej masy.

Sekwencja LiverLab

Badanie przeprowadzono zgodnie z protokołem oceny spichrzenia żelaza na licencji oprogramowania firmy Siemens. Ze względu na czasowy brak zgody producenta badanie wykonano u 38 pacjentów. Zgodnie z protokołem podjęto próbę automatycznego ustalenia VOI (volume of interest, objętości zainteresowania), jednak ze względu na nieuzyskanie prawidłowych obrazów i zachodzenie anatomiczne mapy na struktury poza wątrobowe, wykonano u każdego chorego ręczne wrysowanie miększu narządu. Obrazowano narząd w sekwencji multiechowej przy użyciu 5 ech. Intensywność sygnału badano ze średniej intensywności 5 ROI w reprezentatywnych miejscach miększu wątroby z ominięciem dużych naczyń krwionośnych oraz z VOI. Intensywność sygnału oceniono w obrazach gradientu echa (GRE) T2* ms oraz obrazach współczynnika $R2^* = 1000/T2^*$ (s⁻¹ albo Hz).

3.3.1.3. Ocena podaży żelaza przed aloSCT oraz do 30 doby po aloSCT.

Celem oceny stopnia narażenia pacjenta na gromadzenie żelaza zliczono ilość jednostek koncentratu krwinek czerwonych, które chory otrzymał od chwili rozpoznania choroby podstawowej do dnia transplantacji a następnie do 30 doby po zabiegu. Źródłem danych były informacje z:

- systemu elektronicznego IRIS Banku Krwi UCK
- historii chorób pacjentów
- Księgi Przetoczeń Kliniki Hematologii i Transplantologii UCK

- wypisów z hospitalizacji i leczenia chorych kwalifikowanych do aloSCT z ośrodków poza Kliniką Hematologii i Transplantologii UCK.

3.3.2. Powikłania transplantacyjne.

U wszystkich chorych przeprowadzono ocenę ilościową i jakościową powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych w okresie do 30 dni procedury transplantacji z uwzględnieniem czasu chemio-radioterapii kondycjonującej.

3.3.2.1. Powikłania infekcyjne

Dokonano oceny ilościowej każdego rodzaju infekcji definiowanych, jako:

- zakażenia bakteryjne: zlokalizowane i uogólnione np.: pneumonia, zapalenie zatok obocznych nosa, zakażenie układu moczowego, sepsa z dodatnimi posiewami, badaniami serologicznymi i molekularnymi potwierdzającymi rozpoznanie lub z ujemnym wynikiem bakteriologicznym z prawidłową odpowiedzią kliniczną na antybiotykoterapię przeciwbakteryjną oraz gorączkę neutropeniczną z odpowiedzią na leczenie przeciwbakteryjne,
- zakażenie wirusowe potwierdzone poziomem materiału genetycznego wirusa powyżej granic czułości metody wymagające wdrożenia leczenia z uwzględnieniem bezobjawowej reaktywacji CMV (cytomegalowirusa)
- zakażenia grzybicze miejscowe, inwazyjne, uogólnione, prawdopodobne i pewne] potwierdzone dodatnim posiewem, badaniem testu galaktomannanowego, mannanowego lub badaniem obrazowym (TK, MRI), w tym także gorączkę neutropeniczną trwająca ponad 72 godziny z odpowiedzią na wdrożone empirycznie leczenie przeciwgrzybicze
- inne, w tym zakażenie *Pneumocystis jiveroci* oraz *Toxoplasma gondii*.

Każdy incydent został oceniony pod względem ciężkości. W analizie wzięto pod uwagę najcięższy stopień każdego zanotowanego rodzaju infekcji. Ze względu na charakter typowych powikłań ałoSCT takich, jak chemiczne zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego wymuszające leczenie preparatami dożylnymi, do oceny stopnia ciężkości infekcji wybrano skalę sprawności i stanu ogólnego ECOG – WHO (Eastern Cooperative Oncology Group) World Health Organization] nieuwzględniającej rodzaju interwencji medycznej - tabela 4. Do stopnia 4 kwalifikowano również chorych z infekcją bezpośrednio zagrażającą życiu, w tym posocznicą.

| stopień | opis |
|---------|---|
| 0 | Sprawność prawidłowa, zdolność do samodzielnego wykonywania codziennych czynności. |
| 1 | Obecność objawów choroby, możliwość chodzenia i wykonywania lekkiej pracy. |
| 2 | Zdolność do wykonywania czynności osobistych, niezdolność do pracy, spędza w łóżku około połowy dnia. |
| 3 | Ograniczona zdolność wykonywania czynności osobistych, spędza w łóżku ponad połowę dnia. |
| 4 | Konieczność opieki osoby drugiej, spędza w łóżku cały dzień. |
| 5 | Zgon. |

Tabela 4 Skala sprawności ECOG - WHO.

Ogólny współczynnik infekcyjny (OWI).

W badanej populacji, na podstawie zgromadzonych danych, dla powikłań infekcyjnych wyznaczono ogólny współczynnik infekcyjny (OWI). Każdemu z rodzajów infekcji: bakteryjnych, grzybiczych, wirusowych i innych nadano wartość „1” w przypadku wystąpienia przynajmniej jednego incydentu zdefiniowanej infekcji w okresie do 30 doby od transplantacji lub „0” w przypadku niezaobserwowania powikłania. OWI stanowiło sumę wartości przyporządkowanych do rodzaju zakażenia. Ze względu na wystąpienie tylko jednej infekcji pierwotniakowej wartość ta została pominięta. Zatem wartość OWI mieściła się w zakresie od 0 do 3.

Ogólny współczynnik ciężkości infekcji (OWCI).

W badanej populacji, na podstawie zgromadzonych danych, dla powikłań infekcyjnych wyznaczono ogólny współczynnik ciężkości infekcji (OWCI). Zgromadzono dane na temat ciężkości każdego rodzaju infekcji przebytych w okresie do 30 doby dla każdego pacjenta przyporządkowując mu wartość OWCI = 0 w przypadku ciężkości infekcji w stopniu 1-2 oraz OWCI = 1 w przypadku wystąpienia najcięższych powikłań w stopniu 3-5.

Ocena białka C-reaktywnego (CRP).

Badanie białka CRP wykonywano według standardowej procedury operacyjnej przed transplantacją a następnie minimum 2 razy w tygodniu oraz dodatkowo w okresie wzmożonej obserwacji pacjenta z powodu powikłań infekcyjnych. Badanie wykonywane było w CLK UCK z próbki krwi w ilości 3 ml pobranej do probówki bez antykoagulantu metodą zgodną ze standardami laboratoryjnymi właściwymi dla testu. W ocenie uzyskanych wyników

posługiwano się normami obowiązującymi w CLK UCK: 0-5,0 mg/l. Do analizy ciężkości infekcji wybrano najwyższy wynik towarzyszący powikłaniom.

Ocena funkcji fagocytarnej granulocytów.

Badanie zdolności fagocytarnej granulocytów przeprowadzano u chorych po uzyskaniu regeneracji układu przy minimalnej ilości komórek badanych 0,5 – 1 G/l. Badanie wykonywane było w Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku z próbki krwi w ilości 2 ml pobranej do probówki z heparyną metodą cytometrii przepływowej, po stymulacji granulocytów znakowanymi bakteriami E.coli według standardów laboratoryjnych właściwych metodzie określonej przez producenta. W ocenie uzyskanych wyników posługiwano się normami obowiązującymi w CLK UCK. Norma dla testu wynosi 70-99% komórek pozytywnych.

3.3.2.2. Powikłania toksyczne

Do najczęstszych powikłań narządowych ałoSCT należą powikłania dotyczące wątroby. Drugą grupę stanowią zaburzenia śródbłonek naczyń składające się w zespół chorób o etiologii mikroangiopatycznej. Do grupy tej zaliczane jest również aGvHD.

Toksyczność wątrobowa.

W okresie obserwacji wykonywano rutynowo badania biochemiczne i enzymatyczne oceniające stopień uszkodzenia wątroby, minimum 2 razy w tygodniu, zgodnie ze standardem opieki około transplantacyjnej obowiązującym w Klinice Hematologii i Transplantologii UCK. Do oceny stopnia uszkodzenia narządu monitorowano następujące parametry:

- aminotransferazę alaninową (AlAT – norma < 55 U/l),
- aminotransferazę asparaginianową (AspAT – norma 5 - 34 U/l),
- gamma-glutamylotranspeptydazę (GGTP – norma 9 - 36 U/l),
- fosfatazę alkaliczną (Falk – norma 37 - 98 U/l),
- bilirubinę całkowitą (Bil – norma 0,1 - 1,2 mg/dl).

Badanie wykonywane było w CLK UCK z próbki krwi w ilości 3 ml pobranej do probówki bez antykoagulantu metodą zgodnie ze standardami laboratoryjnymi właściwymi metodzie określonej przez producenta. W ocenie uzyskanych wyników posługiwano się normami obowiązującymi w CLK UCK podanymi powyżej.

Do analizy ciężkości uszkodzenia wątroby wybrano najwyższy wynik jednego z ocenianych parametrów towarzyszący powikłaniom w skali 1-4 Common Terminology Criteria for Adverse Events [CTCAE], wersja 4.0 przedstawionej w poniższej tabeli. Nie podjęto oceny funkcji wątroby [proteinogramu i układu krzepnięcia, głównie wskaźnika protrombinowego i fibrynogenu] z powodu standardowego leczenia substytucyjnego wyrównującego ewentualne niedobory. Za 5 stopień ciężkości uznano zgon z powodu toksyczności wątrobowej.

| parametr | wielokrotność ponad górną granicę normy | | | |
|----------|---|------------|-------------|------------|
| | stopień I | stopień II | stopień III | stopień IV |
| AlAT | do 3 | 3 do 5 | 5 do 20 | ponad 20 |
| AspAT | do 3 | 3 do 5 | 5 do 20 | ponad 20 |
| GGTP | do 2,5 | 2,5 do 5 | 5 do 20 | ponad 20 |
| Falk | do 2,5 | 2,5 do 5 | 5 do 20 | ponad 20 |
| Bil | do 1,5 | 1,5 do 3 | 3 do 10 | ponad 10 |

Tabela 5 Wybrane parametry wątrobowe skali CTCAE, wersja 4.0.

Choroba wenookluzyjna wątroby

Rozpoznanie choroby wenookluzyjnej wątroby i oceny stopnia jej ciężkości dokonywano według kryteriów Baltimore [hiperbilirubinemia > 2 mg/dl i przynajmniej 2 z następujących kryteriów: bolesna hepatomegalia, przyrost masy ciała $> 5\%$ masy wyjściowej, wodobrzusze

| | stopnie ciężkości VOD | | |
|--------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| | lekka | umiarkowana | ciężka |
| bilirubina mg/dl | < 5 | 5,1 - 8,0 | > 8 |
| AIAT, AspAT | $< 3 \times$ GGN | 3 - 8 x GGN | $> 8 \times$ GGN |
| przyrost wyjściowej masy ciała | $< 2\%$ | 2 - 5% | $> 5\%$ |
| kreatynina | w normie | $< 2 \times$ GGN | $> 2 \times$ GGN |
| szybkość narastania objawów | powolna | umiarkowana | gwałtowna |

Tabela 6 Stopień ciężkości VOD. GGN – górna granica normy. [50]

Inne powikłania mikroangiopatyczne.

Grupę powikłań mikroangiopatycznych, trudnych do rozpoznania ze względu na możliwość nakładania się objawów klinicznych poszczególnych jednostek diagnozowano retrospektywnie na podstawie symptomów klinicznych i laboratoryjnych po wykluczeniu innych przyczyn. W rozpoznaniu oparto się na kryteriach opublikowanych w podręczniku Europejskiej Grupy ds. Transplantacji Szpiku (European Bone Marrow Transplantation – EBMT Handbook). Ze względu na rzadkość powikłań i brak powszechnie przyjętych skal ciężkości nie podjęto oceny ich nasilenia. Do grupy tej należały:

1. Mikroangiopatia związana z transplantacją (transplant associated microangiopathy - TAM / mikroangiopatia zakrzepowa thrombotic

microangiopathy – TMA) i jej manifestacje kliniczne – zespół hemolityczno – mocznicowy [HUS], płamica zakrzepowo-małopłytkowa [TTP].

2. Zespół przesiąkania włóścikowego [capillary leak syndrome - CLS].
3. Zespół wszczepienia [engraftment syndrome - ES].
4. Rozlane krwawienie pęcherzykowe [diffuse alveolar haemorrhage - DAH].
5. Idiopatyczne zapalenie płuc [idiopathic pneumonia syndrome - IPS].

3.3.2.3. Ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Dane o wystąpieniu i ciężkości aGvHD kolekcjonowano w oparciu o kryteria klasyfikacyjne EBMT. Oceniano wystąpienie postaci klasycznej aGvHD rozpoznawanej do 100 doby po transplantacji włącznie. Stopień ciężkości oceniano według skali Glucksberga.

| stopień | skóra | wątroba | przewód pokarmowy |
|---------|--|------------------|---|
| | zmiany rumieniowo-grudkowe | bilirubina mg/dl | biegunka w ml |
| + | <25% powierzchni ciała | 1,9 - 2,9 | > 500 |
| ++ | 25 - 50 % powierzchni ciała | 2,98 - 5,9 | > 1000 |
| +++ | uogólniona erythrodermia | 6,0 - 14,9 | > 1500 |
| ++++ | uogólniona erythrodermia z pęcherzami i złuszczeniem | > 14,9 | ból jamy brzusznej +/- niedrożność jelit |

Tabela 7 Stopień ciężkości objawów aGvHD specyficzny dla poszczególnych narządów.

| stopień aGvHD | narząd | stopień nasilenia objawów w poszczególnych narządach |
|---------------|-------------------|--|
| I | skóra | + do ++ |
| | skóra | + do ++ |
| II | wątroba | + |
| | przewód pokarmowy | + nieznaczny spadek stanu ogólnego |
| III | skóra | ++ do +++ |
| | wątroba | ++ do +++ |
| | przewód pokarmowy | ++ do +++ znaczny spadek stanu ogólnego |
| IV | skóra | ++ do ++++ |
| | wątroba | ++ do ++++ |
| | przewód pokarmowy | ++ do ++++ ekstremalny spadek stanu ogólnego |

Tabela 8 Stopień ciężkości aGvHD wg Glucksberga.

3.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o pakiet oprogramowania Statistica 12 firmy StatSoft Polska.

Analizę zmiennych kategoryzacyjnych przeprowadzono za pomocą testów chi-kwadrat: Pearsona, z poprawką Yates, gdy liczebność grupy była mniejsza niż 10, oraz Największej Wiarygodności. Do porównań wyników badań wykonywano analizę za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya. Normalność rozkładu zmiennych ciągłych [stężenie ferrytyny] sprawdzono testem W. Shapiro – Wilka. Wpływ spichrzenia żelaza wyrażony stężeniem ferrytyny i parametrami obrazów MRI na oceniane parametry kliniczne badano przy użyciu analizy wariacyjnej ANOVA rang Kruskala Wallisa. W wynikach analizy statystycznej podano obliczony poziom istotności $p < 0,05$ interpretowany, jako znamienne statystycznie.

4. WYNIKI

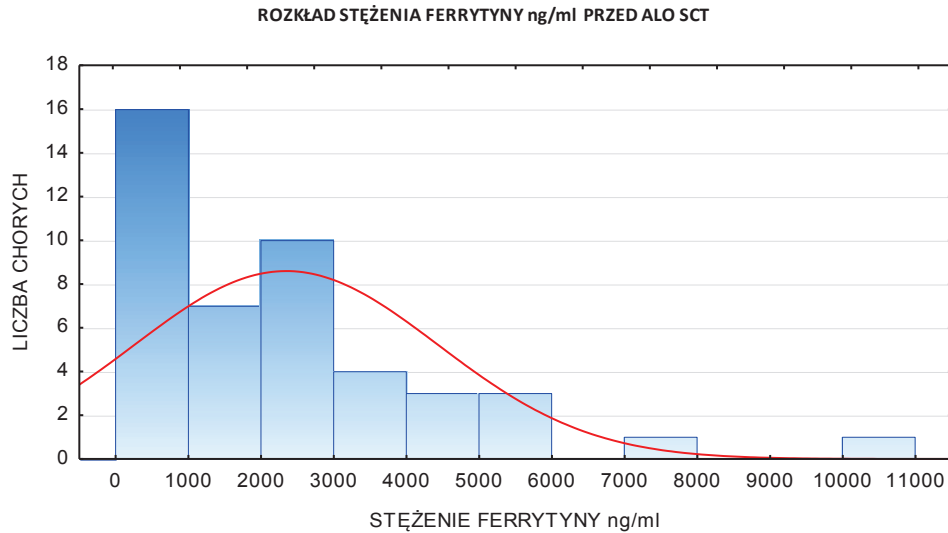
4.1. Ocena spichrzenia żelaza.

4.1.1. *Stężenie ferrytyny jako wyznacznik stopnia przeładowania żelazem*

Ocenę ferrytyny w okresie przedprzeszczepowym wykonano u wszystkich 45 chorych. Średnie stężenia, mediana, wartości minimalne i maksymalne nie różniły się istotnie statystycznie między kobietami i mężczyznami w grupie badanej. Rozkład stężeń ferrytyny nie wykazywał cech rozkładu normalnego.

| ferrytyna ng/ml | kobiety | mężczyźni | razem | p |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----|
| przed aloSCT | | | | |
| średnia (SD) | 2851 (2123) | 2009 (2035) | 2346 (2089) | NS |
| mediana | 2855 | 1512 | 1960 | |
| minimum | 105 | 46 | 46 | |
| maksimum | 7018 | 10204 | 10204 | |

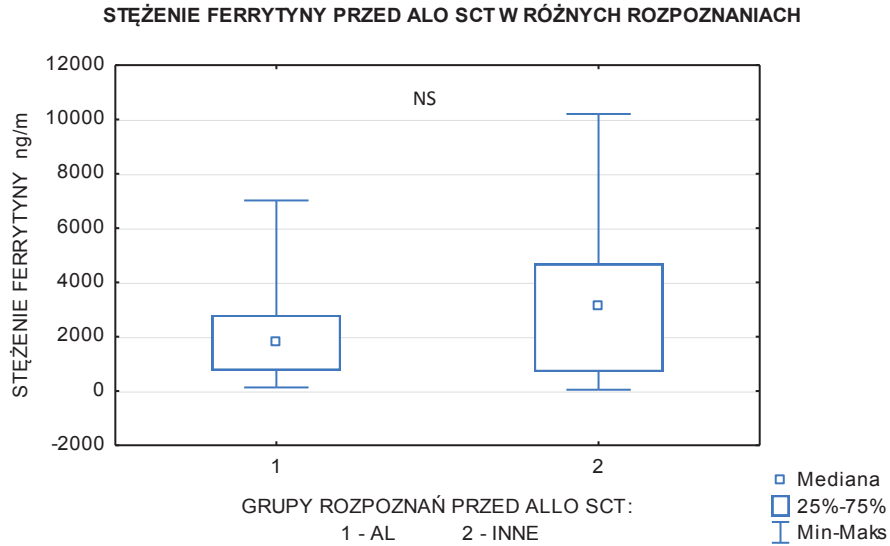
Tabela 9 Stężenie ferrytyny w ng/ml w populacji 45 chorych przed aloSCT.



Rycina 10 Rozkład stężenia ferrytyny przed aloSCT u 45 chorych poddanych obserwacji.

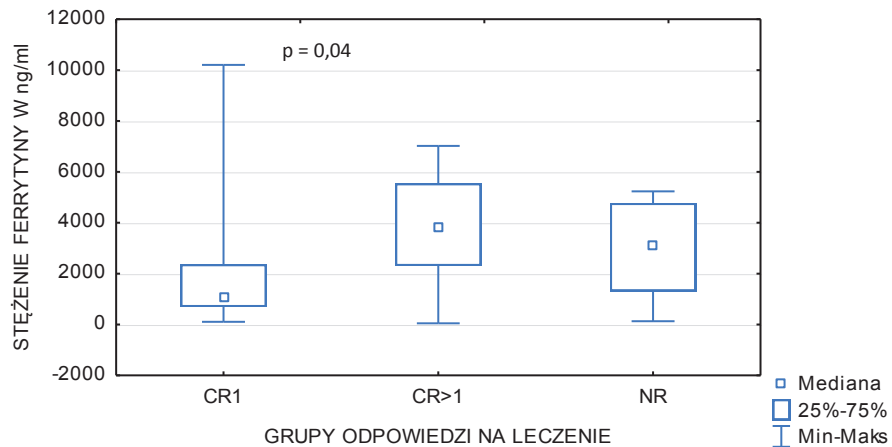
Stężenie ferrytyny powyżej 1000 ng/ml i powyżej 2000 ng/ml stwierdzono odpowiednio u 29 i 20 chorych (64% i 45% badanej grupy).

Wartości stężenia ferrytyny określone w badanej grupie przed aloSCT nie wykazywały istotnych różnic między grupą chorych na ostre białaczki i innych chorób. Stwierdzono natomiast istotne różnice w stężeniu ferrytyny w zależności od odpowiedzi na zastosowane leczenie oraz w zależności od czasu, który upłynął między diagnozą a czasem do transplantacji, co obrazują wykresy 4 – 6.



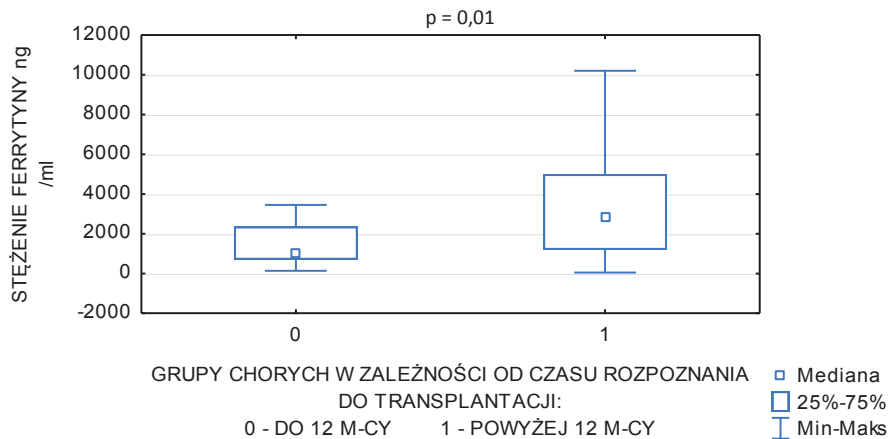
Rycina 11 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w dwóch grupach diagnostycznych: 1 – chorzy z rozpoznaniem ostrej białaczki [AL.], 2 – chorzy z innymi rozpoznaniemiami.

STĘŻENIE FERRYTYNY PRZED ALO SCT W ZALEŻNOŚCI OD ODPOWIEDZI NA LECZENIE



Rycina 12 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie (CR1 – pierwsza całkowita remisja, CR>1 – kolejne remisje, NR – brak remisji).

STĘŻENIE FERRYTYNY PRZED ALO SCT ZALEŻNIE OD CZASY TRWANIA CHOROBY



Rycina 13 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w dwóch grupach chorych w zależności od czasu od rozpoznania do transplantacji.

Oceniono korelację stężenia ferrytyny przed aloSCT z ilością jednostek KKCz przetoczonych do czasu transplantacji, stężeniem hemoglobiny (Hgb) oraz ze stężeniem CRP przed przeszczepieniem.

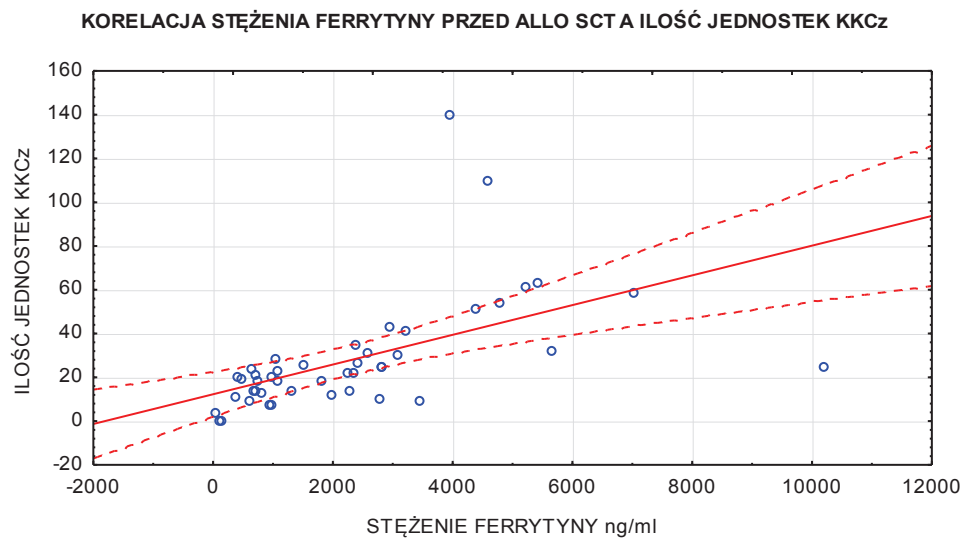
| średnia i odchylenie standardowe | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| przed transplantacją | średnia mediana |
| KKCz [jednostki] | 28 (26,3) 22 (0-140) |
| Hgb [g/dl] | 10,8 (2,1) 11,0 (6,4 -16,1) |
| CRP [mg/dl] | 13,3 (26,7) 5,9 (0,4-155) |

Tabela 10 Średnia podaż KKCz, średnie stężenie Hgb i CRP w populacji 45 chorych przed aloSCT.

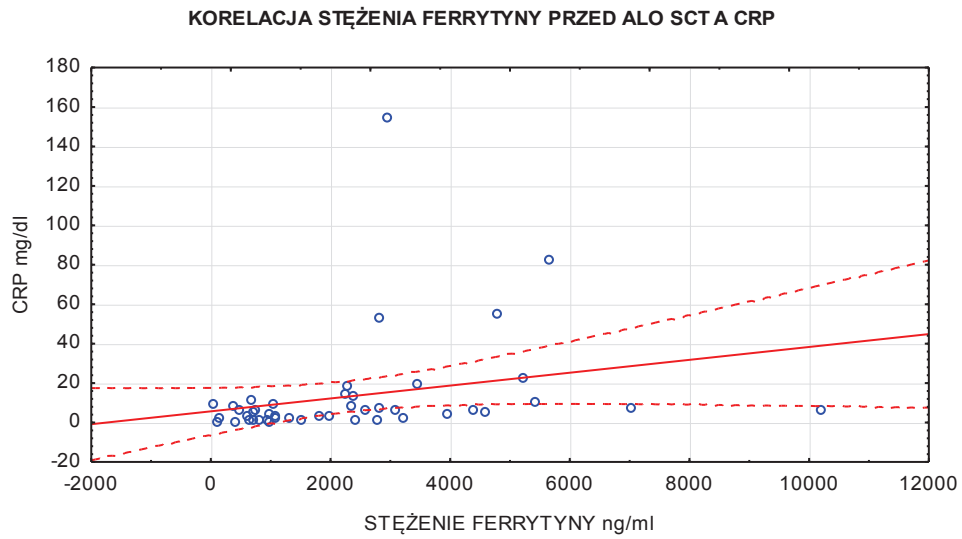
Stwierdzono dodatnią korelację stężenia ferrytyny z ilością przetoczonych jednostek KKCz i ujemną korelację ze stężeniem Hgb. Nie stwierdzono korelacji ferrytyny z innym białkiem ostrej fazy - CRP. Zależności zobrazowano w tabeli 11 i na rycinach 14 i 15.

| | korelacja | p |
|---|--------------|-------------|
| ferrytyna a ilość przetoczonych KKCz przed aloSCT | $r = 0,54$ | $p < 0,001$ |
| ferrytyna a stężenie Hgb przed aloSCT | $r = - 0,38$ | $p = 0,01$ |
| ferrytyna a CRP przed aloSCT | $r = 0,25$ | $p = 0,09$ |

Tabela 11 Korelacja stężenia ferrytyny przed aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz, stężeniem hemoglobiny i CRP.



Rycina 14 Korelacja stężenia ferrytyny przed aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz od chwili rozpoznania do momentu transplantacji u 45 chorych.



Rycina 15 Korelacja ferrytyny przed aloSCT ze stężeniem CRP przed aloSCT u 45 chorych badanej populacji.

U wszystkich chorych oceniono związek przetoczeń KKCz w okresie 30 dni od transplantacji ze stężeniem ferrytyny w 30 dobie oraz z przyrostem jej stężenia w tym okresie. Wartości stężeń oraz średnie wartości zmiany stężenia przedstawiono w tabeli 12. Średnie zapotrzebowanie na przetoczenia KKCz wynosiło 4,8 jednostek (SD 4,9), mediana 4, (0-18).

| ferrytyna ng/ml | kobiety | mężczyźni | razem | p |
|---|----------------|----------------|----------------|-----|
| ferrytyna w 30 dobie po aloSCT | | | | |
| średnia (SD) | 6416 (4789) | 3603 (2183) | 4729 (3690) | |
| mediana | 6108 | 3390 | 3965 | NS* |
| minimum | 604 | 509 | 509 | |
| maksimum | 17027 | 11765 | 17027 | |
| przyrost stężenie ferrytyny w 30 dobie po aloSCT | | | | |
| średnia (SD) | 3563 (3480) | 1594 (1340) | 2383 (2587) | |
| mediana | 2291 | 1427 | 1590 | NS |
| minimum | 195 | -881 | -881 | |
| maksimum | 12252 | 4032 | 12252 | |

Tabela 12 Stężenie ferrytyny w ng/ml w 30 dobie aloSCT i jej przyrost w stosunku do parametrów wyjściowych w obserwowanej populacji 45 chorych. *Wartość granicznie nieistotna statystycznie [p=0,05].

Średni wzrost stężenia ferrytyny w całej badanej populacji, w okresie procedury przeszczepowej przekraczał 2000 ng/ml.

Stwierdzono, że zarówno stężenie ferrytyny w dobie 30, jak i wielkość przyrostu jej stężenia koreluje z ilością przetoczonych jednostek KKCz. Analiza rozrzutu danych wykazała, że u czworga pacjentów wystąpił znacznie odbiegający od stwierdzonego u pozostałych 41 badanych przyrost stężenia ferrytyny przy ilości przetoczonych jednostek KKCz poniżej średniej dla grupy. Po wyłączeniu

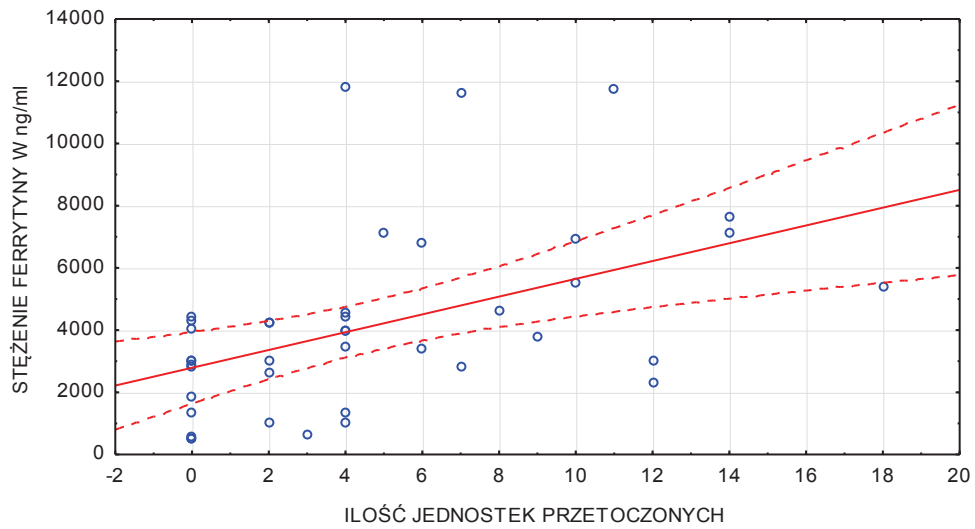
danych tych pacjentów z analizy zanotowano jedynie korelację stężenia ferrytyny w 30 dobie z przetoczonymi jednostkami KKCz. Nie wykazano natomiast korelacji różnicy stężeń ferrytyny z podażą KKCz. Stwierdzono korelację obu parametrów (stężenia ferrytyny i zmiany stężenia) z maksymalnym CRP w czasie 30 dni przeszczepienia.

Zbadano związek między stężeniem ferrytyny przed i po transplantacji oraz przyrostem jej stężenia w okresie 30 dni procedury. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem ferrytyny przed i po przeszczepieniu, natomiast przyrost jej stężenia nie wykazywał korelacji ze stężeniem przed aloSCT. Powyższe wyniki zobrazowano w tabeli 13 i na rycinie 10.

| | korelacja | p |
|---|------------|-----------|
| analiza 45 chorych | | |
| stężenie ferrytyny a ilość przetoczonych jednostek KKCz w dobie 30 po aloSCT | r = 0,47 | p = 0,001 |
| przyrost stężenia ferrytyny a ilość przetoczonych jednostek KKCz w dobie 30 po aloSCT | r = - 0,33 | p = 0,03 |
| stężenie ferrytyny a maksymalne CRP w dobie 30 po aloSCT | r = 0,43 | p = 0,003 |
| przyrost stężenia ferrytyny a maksymalne CRP w dobie 30 po aloSCT | r = 0,44 | p = 0,002 |
| analiza 41 chorych | | |
| stężenie ferrytyny a ilość przetoczonych jednostek KKCz w dobie 30 po aloSCT | r = 0,47 | p = 0,002 |
| przyrost stężenia ferrytyny a ilość przetoczonych jednostek KKCz w dobie 30 po aloSCT | r = - 0,28 | NS |
| analiza 45 chorych | | |
| stężenie ferrytyna w dobie 30 a stężenie ferrytyny przed aloSCT | r = 0,73 | p < 0,000 |
| przyrost stężenia ferrytyny a stężenie ferrytyny przed aloSCT | r = - 0,24 | NS |

Tabela 13 Współczynnik korelacji stężenia ferrytyny i przyrostu jej stężenia w 30 dobie po aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz i stężeniem ferrytyny przed procedurą.

STĘŻENIE FERRYTYNY A LICZBA JEDNOSTEK KKCZ W OKRESIE PROCEDURY ALLO SCT



Rycina 16 Korelacja ferrytyny z ilością przetoczonych KKCz w okresie procedury ałoSCT u 43 chorych poddanych obserwacji. Dane po usunięciu danych odstających.

4.1.2. Badanie MRI, jako wskaźnik stopnia spichrzenia żelaza ogólnoustrojowego.

Jako alternatywny wskaźnik zawartości żelaza w wątrobie i pośrednio oceny obciążenia organizmu żelazem przyjęto badanie metodą MRI.

U 45 chorych wykonano po 30 dobie aIoSCT obrazowanie techniką MRI w klasycznych, wcześniej opisanych obrazach oceniających LIC: metodą Gandona, sekwencjami multiechowymi T2* i R2*. U jednego chorego po wykonaniu badania z powodu błędu technicznego nie była możliwa ocena uzyskanego materiału badawczego.

U 38 chorych oceniono LIC w metodzie MRI zgodnie z oprogramowaniem i licencją firmy Simens LiverLab oceniającej całą objętość wątroby. U części chorych zaobserwowano nieprawidłowe mapowanie narządu. Dotyczyło to szczególnie pacjentów z prawdopodobnym, skrajnie wysokim obciążeniem żelazem. Podjęto próbę manualnego wyznaczenia obrysu wątroby. Z powodu wysokiego prawdopodobieństwa błędu metody, uzyskane wyniki w obrazowaniu LiverLab zostaną przedstawione, choć nie mogły być brane pod uwagę w dalszej analizie.

Wyniki sygnału poszczególnych technik MRI wątroby korelujące z wzorcowym stężeniem żelaza na g suchej masy wątroby w badaniach histopatologicznych skorelowano ponownie z ilością przetoczeń KKCz oraz ze stężeniem ferrytyny we wcześniej zdefiniowanych punktach czasowych. Stwierdzono dodatnią, istotną korelację wyników LIC w metodzie MRI we wszystkich sekwencjach, z ilością przetoczonych jednostek KKCz oraz ze stężeniem ferrytyny przed i po transplantacji. Natomiast nie stwierdzono zależności między LIC (poza sekwencją Gandona) a przyrostem stężenia ferrytyny w okresie procedury przeszczepowej. Wyniki przedstawiono w tabeli 14.

| korelacja MRI z: | KKCz "30" | ferrytyna "0" | ferrytyna "30" | ferrytyna "0-30" |
|---|-----------|---------------|----------------|------------------|
| sekwencja Gandona | | | | |
| średnia (SD) stężenie Fe w umol / g w badanej populacji 44 osób - 169,77 (98,77) | | | | |
| korelacja | 0,48 | 0,77 | 0,79 | 0,5 |
| p | p = 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| sekwencja multiechowa T2* | | | | |
| średnia (SD) intensywność sygnału w ms w badanej populacji 44 osób - 9,11 (6,9) | | | | |
| korelacja | -0,38 | -0,49 | -0,49 | -0,3 |
| p | p = 0,01 | p = 0,001 | p = 0,001 | NS |
| sekwencja multiechowa R2* | | | | |
| średnia (SD) intensywność sygnału w 1/s w badanej populacji 44 osób - 147,9 (60,9) | | | | |
| korelacja | 0,4663 | 0,56 | 0,5 | 0,26 |
| p | p = 0,001 | p < 0,001 | p = 0,001 | NS |
| sekwencja LiverLab T2* | | | | |
| średnia (SD) intensywność sygnału w ms w badanej populacji 38 osób - 97,5 (70) | | | | |
| korelacja | -0,33 | -0,5 | -0,6 | -0,42 |
| p | p = 0,05 | p = 0,002 | p < 0,001 | p = 0,008 |
| sekwencja LiverLab R2* | | | | |
| średnia (SD) intensywność sygnału w 1/s w badanej populacji 38 osób - 124,8 (64,1) | | | | |
| korelacja | 0,45 | 0,35 | 0,48 | 0,38 |
| p | p = 0,004 | p = 0,03 | p = 0,003 | p = 0,02 |

Tabela 14 Korelacja obrazów MRI w różnych sekwencjach z ilością przetoczonych jednostek KKCz, stężeniem ferrytyny i CRP w zdefiniowanych wcześniej punktach czasowych procedury.

4.2. Zaburzenia gospodarki żelazowej a wystąpienie powikłań infekcyjnych we wczesnym okresie po ałoSCT.

4.2.1. Stężenie Ferrytyny a powikłania infekcyjne.

Powikłania infekcyjne obserwowano u przeważającej ilości chorych.

Większość infekcji stanowiły zakażenia bakteryjne: 44 osoby (97,8%) przebyły przynajmniej jeden zdefiniowany wcześniej epizod zakażenia bakteryjnego. Obserwowano również wielokrotne epizody infekcji bakteryjnych (2 epizody – 14 osób (31,1%), 3 – 8 (17,8%), 4 – 7 (15,6%)). Najwięcej chorych prezentowało 2 stopień ciężkości infekcji (64,4%), 3 i 4 stopień stwierdzono odpowiednio u 13,3%, i 20%. Najwyższe CRP w trakcie wszystkich powikłań infekcyjnych wynosiło średnio 156,9 mg/dl (SD 75,0).

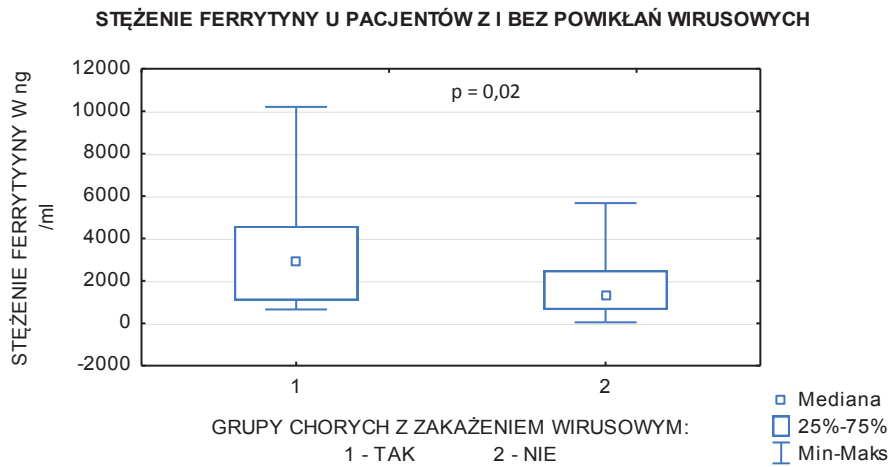
Nie stwierdzono korelacji między stężeniem ferrytyny przed i w 30 dobie ałoSCT z wystąpieniem, ilością i ciężkością zakażeń bakteryjnych.

Rzadsze powikłania wirusowe i grzybicze występowały odpowiednio u 17 (37,8%) i 7 (15,6%) pacjentów. Wśród osób, które przebyły infekcje wirusowe obserwowano zakażenie przynajmniej 2 patogenami u 6 osób (13,3% całej grupy). Ciężkość powikłań wirusowych i grzybiczych wśród grupy badanej przedstawiono w tabeli 15.

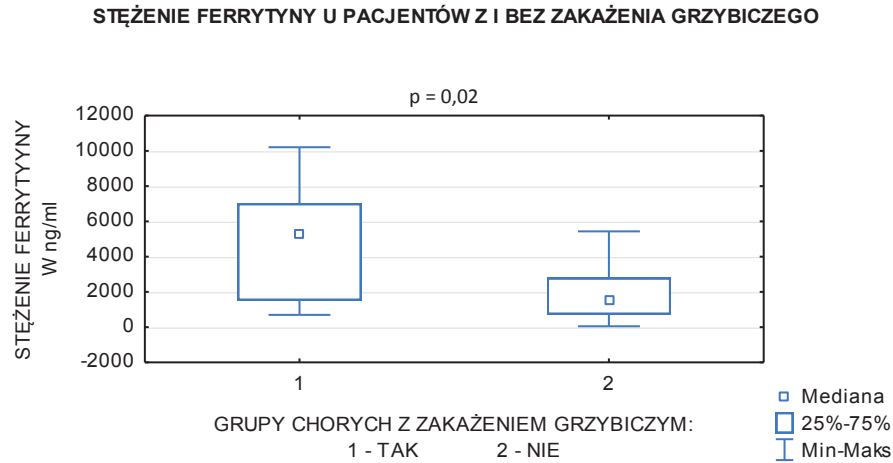
| rodzaj infekcji | stopień ciężkości | | | |
|-----------------|-------------------|-----------|---------|---------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| wirusowa | 9 (20%) | 6 (13,3%) | 1(2,2%) | 1(2,2%) |
| grzybicza | 3(6,7%) | 3(6,7%) | 1(2,2%) | |

Tabela 15 Rozkład ciężkości zakażeń wirusowych i grzybiczych wśród 45 chorych do 30 doby ałoSCT.

Wykazano istotną statystycznie różnicę stężenia ferrytyny zarówno przed transplantacją jak i w 30 dobie po procedurze u pacjentów z i bez powikłań wirusowych i grzybiczych. W ocenie stopnia ciężkości i ilości obu infekcji nie wykazano istotnych różnic stężenia ferrytyny.



Rycina 17 Występowanie zakażeń wirusowych w zależności od ferrytyny przed aloSCT wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.



Rycina 18 Występowanie zakażeń grzybiczych w zależności od ferrytyny wyjściowej wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.

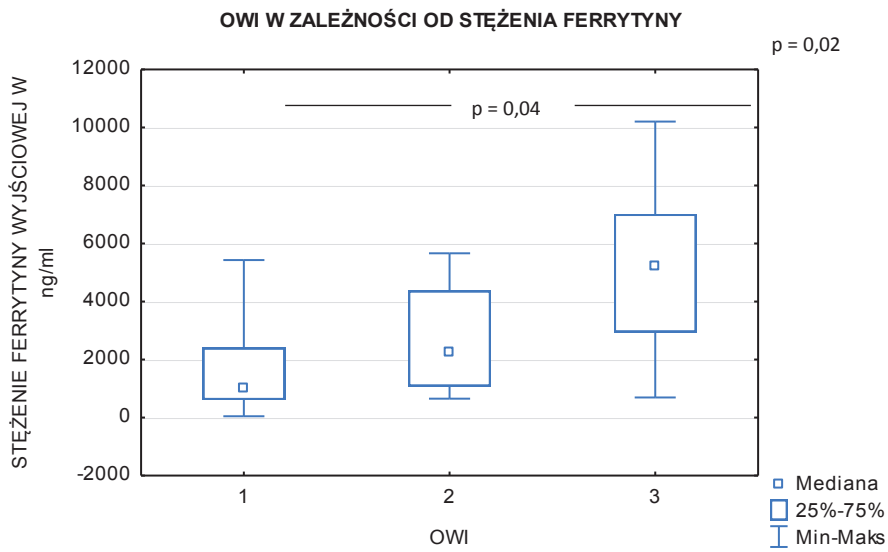
Oceniono współwystępowanie w okresie 30 dni aloSCT incydentów infekcyjnych o różnej etiologii oraz ich skumulowanej ciężkości ocenionych poprzez wyznaczenie wskaźników OWI i OWCI. Wartości wskaźników przedstawiono w tabeli 16.

| | OWI | | | OWCI | |
|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 |
| ilość osób | 26 (57,8%) | 14 (31,1%) | 5 (11,1%) | 30 (66,7%) | 15 (33,3%) |

Tabela 16 Wskaźnik OWI i OWCI wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.

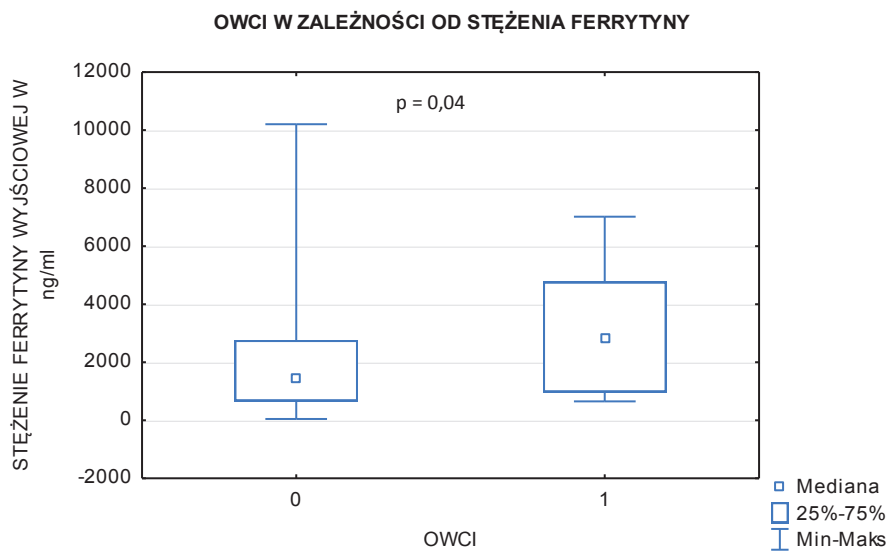
Stwierdzono istotne statystycznie różnice wyjściowego stężenia ferrytyny w zależności od współczynnika OWI. Istotnie wyższe stężenie ferrytyny przed transplantacją występowało u pacjentów z trzema incydentami infekcyjnymi. Wartość stężenia ferrytyny przed aloSCT dla wskaźnika OWI-1 (pacjenci z jednym incydentem infekcyjnym w trakcie procedury) była istotnie niższa od wskaźnika OWI-3 (pacjenci z 3 incydentami infekcyjnymi).

Podobną zależność stwierdzono dla stężenia ferrytyny w dobie 30 aloSCT ($p = 0,007$; $p = 0,02$ odpowiednio). Istotnie wyższe, potransplantacyjne stężenia ferrytyny występowały u pacjentów z wieloma incydentami infekcyjnymi. Nie potwierdzono natomiast zależności między różnicą stężenia ferrytyny wyjściowej a w dobie 30 aloSCT.



Rycina 19 Zależność wskaźnika OWI od stężenia ferrytyny przedtransplantacyjnej u 45 chorych po aloSCT.

Skumulowana ciężkość infekcji wyrażona współczynnikiem OWCI wykazywała istotną statystycznie zależność od stężenia ferrytyny, zarówno przed transplantacją jak i w dobie 30. Ponownie nie potwierdzono korelacji między OWCI a różnicą stężeń ferrytyny przedtransplantacyjnej i w dobie 30 procedury.



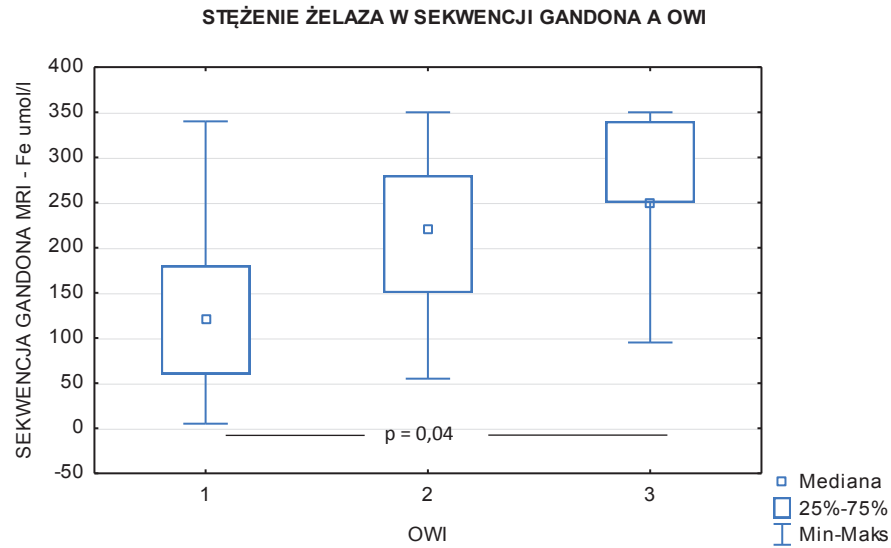
Rycina 20 Zależność wskaźnika OWCI od stężenia ferrytyny przed aloSCT u 45 obserwowanych chorych.

4.2.2. MRI a powikłania infekcyjne.

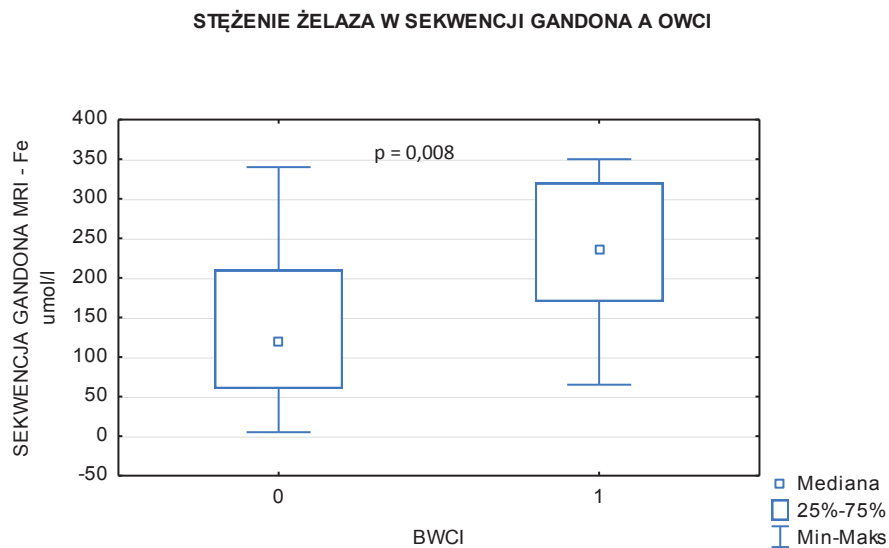
Zbadano zależności wszystkich ocenianych wcześniej parametrów infekcyjnych z LIC w poszczególnych metodach opartych o MRI. Stwierdzono, że jedynie LIC oceniony metodą Gandona wykazuje istotne różnice w zależności od wystąpienia lub braku powikłań wirusowych i grzybiczych. Istotne różnice w LIC ocenianym tą metodą wykazano pomiędzy stopniami OWI i OWCI.

| | m. Gandona | MRI T2* | MRI R2* |
|-----------------------------|--------------------------|---------|---------|
| zakażenia bakteryjne | | | |
| wystąpienie | NS | NS | NS |
| ilość | NS | NS | NS |
| ciężkość [1-5] | NS | NS | NS |
| zakażenia wirusowe | | | |
| wystąpienie | p = 0,006 | NS | NS |
| ilość | NS | NS | NS |
| ciężkość [1-5] | NS | NS | NS |
| zakażenia grzybicze | | | |
| wystąpienie | p = 0,04 | NS | NS |
| ciężkość [1-5] | NS | NS | NS |
| OWI | | | |
| grupy [1-3] | między 1 a 3 p = 0,04 | NS | NS |
| OWCI | | | |
| grupy [0-1] | p = 0,008 | NS | NS |

Tabela 17 Zależność między stężeniem żelaza w wątrobie w różnych sekwencjach obrazu MRI a wystąpieniem powikłań infekcyjnych wśród 44 chorych do 30 doby aIoSCT.



Rycina 21 Zależność wskaźnika OWI od stężenia żelaza w wątrobie w sekwencji Gandona u 44 chorych po aloSCT.



Rycina 22 Zależność wskaźnika OWCI od stężenia żelaza w wątrobie w sekwencji Gandona u 44 chorych po aloSCT.

4.3. Zaburzenia gospodarki żelazowej a wystąpienie powikłań nieinfekcyjnych we wczesnym okresie po aloSCT.

4.3.1. Częstość występowania i stopień ciężkości najczęstszych powikłań nieinfekcyjnych

Występowanie powikłań nieinfekcyjnych, ich częstość i ciężkość przedstawiono w tabeli 18. Najczęściej obserwowano toksyczność wątrobową inną niż VOD oraz chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi w stopniu od lekkiego do umiarkowanego. Powikłania ciężkie, zagrażające życiu stanowiły niewielki odsetek.

| powikłanie | kobiety | mężczyźni | razem | p |
|------------------------------|---------|-----------|-------|----------|
| liczba chorych | 18 | 27 | 45 | |
| aGvHD | | | | |
| występowanie | 14 | 13 | 27 | NS |
| ciężkość | | | | |
| 1 | 3 | 5 | 8 | p = 0,04 |
| 2 | 3 | 6 | 9 | |
| 3 | 5 | 2 | 7 | |
| 4 | 3 | | 3 | |
| VOD | | | | |
| występowanie | 2 | 5 | 7 | NS |
| ciężkość | | | | |
| lekka | 1 | 4 | 5 | NS |
| umiarkowana | | | | |
| ciężka | 1 | 1 | 2 | |
| toksyczność wątrobowa | | | | |
| występowanie | 11 | 18 | 29 | NS |
| ciężkość | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 6 | NS |
| 2 | 5 | 9 | 14 | |
| 3 | 4 | 5 | 9 | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| TAM | | | | |
| występowanie | 1 | 5 | 6 | NS |

Tabela 18 Powikłania nieinfekcyjne, ich częstość i ciężkość wśród 45 chorych do 30 doby ałoSCT.

4.3.2. Stopień gromadzenia żelaza a najczęstsze powikłania nieinfekcyjne

Nie stwierdzono istotności statystycznej między żadną z cech badanych powikłań nieinfekcyjnych a ferrytyną i intensywnością sygnał obrazów MRI skorelowanych ze stężeniem żelaza w wątrobie we wszystkich sekwencjach.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Alogeniczna transplantacja hematopoetycznych komórek progenitorowych jest obecnie często stosowaną techniką terapeutyczną w wielu chorobach rozrostowych oraz innych zaburzeniach krwiotworzenia. Chorzy poddawani tej procedurze, w wyniku występujących czasowo lub trwale zaburzeń erythropoezy oraz przede wszystkim w wyniku terapii związanej z licznymi przetoczeniami koncentratu krwinek czerwonych (KKCz), narażeni są na istotne przeładowanie organizmu żelazem. Podstawy wiedzy o występowaniu spichrzenia żelaza u chorych poddawanych transplantacji pochodzą pierwotnie z badań oceniających dzieci i młodych dorosłych z rozpoznaniem wrodzonych anemii hemolitycznych, które ekstrapolowane są na nieliczne badania wśród chorych po ałoSCT wykonywanej z innych powodów.

Organizm człowieka nie ma wykształconych mechanizmów regulujących i zwiększających usuwanie żelaza, dlatego jego kumulacja zależy w dużej mierze od nadmiernej podaży. Szacuje się, że jedna jednostka KKCz zawiera 200 – 250 mg żelaza. Starsze badania wskazywały, że przeładowanie organizmu żelazem pojawia się u osób dorosłych przeciętnie po 100 -150 jednostkach KKCz, co odpowiada 25-40 g żelaza, jednakże badania wśród osób poddanych transplantacji komórek macierzystych krwiotworzenia dowiodły, iż stan taki pojawia się wcześniej - po średnio 50-60 jednostkach. [60, 61] Co więcej, aktualne dane w literaturze wskazują, że skłonność do gromadzenia żelaza w organizmie ma charakter indywidualny i u części pacjentów można się go spodziewać już po 10-20 jednostkach KKCz. [35, 62] Poddani badaniu chorzy byli wielokrotnymi biorcami przetoczeń wielu jednostek KKCz. (średnia 28 jednostek). Tylko 7 osób z badanej grupy wymagało przetoczeń poniżej 10 jednostek, w tym 2 pacjentów, którzy do transplantacji przystępowali bez wcześniejszej transfuzji preparatów krwinek czerwonych.

Okres pierwszych 30 dni transplantacji u większości chorych nie był obciążony istotnym zapotrzebowaniem na substytucję KKCz (średnio 4,8 jednostek) zatem większość zgromadzonego żelaza po aloSCT wynika z terapii przygotowującej do procedury.

Wątroba jest głównym magazynem żelaza ustrojowego i według znacznej większości badaczy indykatorem przeładowania ogólnoustrojowego tym pierwiastkiem. Wskaźnikiem obciążenia jest ilość żelaza na gram suchej masy wątroby (mg/g suchej masy – mg/g sm).[43, 45, 46] Wartości mieszczące się w granicach normy nie przekraczają 1,8 mg/g sm. Odkładanie się depozytów żelaza powoduje wzrost stężenia pierwiastka w wątrobie do 3-7 mg/g sm., co odpowiada wartościom stwierdzanym u nosicieli heterozygotycznej mutacji wrodzonej hemochromatozy. Nadmiar gromadzonego żelaza był widoczny w tej grupie chorych po 1 -2 latach zależności od transfuzji, jednakże objawy toksycznego uszkodzenia tkanek obserwowane były dopiero po wielu latach (średnio 10). Stwierdzone wówczas stężenie żelaza wątrobowego LIC sięgało 7-15 mg/g sm., a cechy zaburzeń i uszkodzenia mięśnia sercowego obserwowane były przy LIC przekraczającym 15 mg/g sm. Odpowiadające temu stanowi stężenie ferrytyny przekraczało 2500 ng/ml [35, 63] Dotychczasowe badania przeprowadzone u chorych poddanych transplantacji komórek progenitorowych hematopoezy z zastosowaniem różnych technik oceny przeładowania żelazem, od markerów biochemicznych surowicy krwi po biopsję wątroby, potwierdzały istotnie częstsze występowanie spichrzenia żelaza w tej populacji pacjentów. Częstość występowania nadmiernego obciążenia żelazem ustrojowym u chorych poddanych aloSCT różni się w piśmiennictwie i szacowana jest na około 34% wśród autotransplantacji oraz 30-60% w przeszczepieniach alogenicznych. [35, 64] Altes i wsp. [65] stwierdzili autopsyjnie, że u 40 % chorych po aloSCT stężenie żelaza w preparatach wątroby przekraczało 5,6 mg/g sm., a średnie stężenie wynosiło 7,7 mg/g sm. W innym badaniu oceniano ferrytynę, jako surogat gromadzenia żelaza w tkankach ustroju. Rose i wsp. [66] stwierdzili u

58% osób po aloSCT podwyższenie ferrytyny powyżej górnej granicy normy. Najnowsze metody oceny odkładania pierwiastka to badania obrazowe MRI, które obecnie są rekomendowane przez FDA do oceny LIC i tym samym stopnia przeładownia organizmu żelazem. W kilku pracach metody te zostały wykorzystane do oceny częstości powikłań wtórnej hemochromatozy, a część z nich została przeprowadzona u biorców aloSCT. W badaniu Majhail i wsp. [67] większość chorych wykazywało podwyższone stężenie ferrytyny, natomiast ferrytyna powyżej 1000 ng/ml występowała w 34% przypadków, z czego 32% populacji badanej z podwyższeniem ferrytyny wykazywało wzrost LIC średnio do 7 mg/g sm., a u 23% chorych powyżej 5 mg/g sm.

Podobnie jak w piśmiennictwie badani przeze mnie chorzy charakteryzowali się podwyższeniem parametrów świadczących o spichrzeniu żelaza. W populacji 45 chorych mediana stężenia ferrytyny przed transplantacją wynosiła 1960 ng/ml (46,1 – 10204 ng/ml), ferrytynę powyżej 1000 ng/ml i 2500 ng/ml stwierdzano odpowiedni u 54% i 37% chorych. W badaniu obrazowym metodą Gandona LIC powyżej 7 mg/ g sm. (>130 umol/g) wystąpił u 54% chorych (24/ 44 chorych ocenionych). Dane te są spójne z dotychczas opublikowanymi i świadczą, że potransfuzyjne spichrzenie żelaza jest częstą patologią wśród biorców alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych.

Tak duże rozpowszechnienie nadmiernej ilości żelaza w organizmie u chorych poddawanych aloSCT spowodowało chęć poznania wpływu tego parametru na przebieg zabiegu i jego wyniki.

Stwarzało to potrzebę określenia właściwego parametru oceniającego homeostazę żelaza oraz korelującego prognostycznie z całkowitym przeżyciem i powikłaniami aloSCT. Dotychczas nie uzyskano konsensu, która z dostępnych metod powinna być rutynowo wykorzystywana w tym celu. Obserwacje oceniające wpływ spichrzenia żelaza na biorców aloSCT wykorzystywały różne metody badawcze.

Referencyjnym badaniem obrazującym zawartość żelaza wątrobowego (LIC) jest badanie histopatologiczne. Mimo, że biopsja wątroby jest procedurą dość bezpieczną [68] to ze względu na jej inwazyjność i konieczność powtarzania jest często nieakceptowaną przez pacjentów. Dodatkowo u chorych ze schorzeniami hematologicznymi i poddawanych ałoSCT mogą istnieć przeciwskazania do wykonania procedury związane z występującymi zaburzeniami w układzie krzepnięcia, takimi jak małopłytkowość. Badanie histopatologiczne poza informacją o spichrzeniu żelaza może jednak dostarczyć dodatkowych informacji o procesach patologicznych wątroby np.: zmianach zapalnych czy włóknieniu. Nie jest to jednak metoda doskonała, ponieważ inne czynniki patologiczne poza spichrzeniem żelaza mogą wpływać znacząco na ocenę LIC w zależności od miejsca biopsji względem zmian patologicznych [69].

Tanią, powtarzalną i dlatego najczęściej wykorzystywaną metodą oceny gospodarki żelazowej są badania biochemiczne białek uczestniczących w metabolizmie żelaza, w szczególności ferrytyny. Jako białko ostrej fazy ferrytyna jest zależna nie tylko od poziomu żelaza i jego metabolizmu, wpływają na nią również infekcje, procesy zapalne a nawet niedobór witaminy C. [70, 71] Chorzy po ałoSCT należą do grupy pacjentów często prezentujących takiego typu powikłania, co powoduje, iż w wielu badaniach tej grupy chorych podważona jest przydatność ferrytyny, jako białka opisującego stan gospodarki żelaza [24, 72]. Dotychczasowe piśmiennictwo prezentuje sprzeczne dane. Badania przeprowadzone w grupie chorych pediatrycznych z wrodzoną anemią hemolityczną sugerowały, że ferrytyna nie koreluje dobrze ze stężeniem żelaza wątrobowego [73, 74]. W sprzeczności z powyższym wnioskiem pozostawały badania przeprowadzane u chorych po ałoSCT bez istotnego stanu zapalnego, z anemią zależną od przetoczeń i ferrytyną powyżej 1000 ng/ml, [75, 76] czy u chorych z beta-talasemią, [63] które wykazały dobrą korelację ferrytyny z ilością przetoczonych jednostek koncentratu krwinek czerwonych [77] lub ze stężeniem żelaza wątrobowego. Bardzo często, jako istotny punkt odcięcia dla ferrytyny

bazowej przyjmowano poziom powyżej 1000 ng/ml, [76] przy którym LIC rzadko był istotnie mniejszy niż stężenie uznane za uszkadzające tkanki - 7 mg/g sm. [35] W swojej analizie Majhail i wsp. stwierdzili również umiarkowaną korelację hiperferrytynemii ze stężeniem żelaza wątrobowego (0.47; $p = 0.04$) oraz istotnie częstsze występowanie ferrytyny > 1000 ng/ml u osób wymagających większej ilości przetoczeń (średnio 24 jednostki versus 6 jednostek $p < 0,01$). Obserwacje te potwierdzono w innym badaniu, w którym stwierdzono zależność ferrytyny od ilości przetoczonych jednostek KKCz przed transplantacją.[75]

W badaniach własnych stwierdzono istotną dodatnią korelację między stężeniem ferrytyną a ilością przetoczonych jednostek KKCz do czasu transplantacji ($p < 0,001$) oraz ujemną, również istotną korelację ze stężeniem hemoglobiny przed transplantacją ($p = 0,01$), natomiast nie zanotowano takiej korelacji z innym białkiem ostrej fazy – CRP ($p = 0,09$). Świadczyć może to o związku przedtransplantacyjnego stężenia ferrytyny głównie z nadmierną podażą żelaza w wyniku przetoczeń, a nie ze stanem zapalnym opisywanym przez CRP. W przeciwieństwie do wyników prezentowanych przez Majhaila i wsp. [35], nie stwierdziłam istotnych różnic między stężeniem ferrytyny przed aloSCT chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki i zespołu mielodysplastycznego wymagających większej ilości przetoczeń w procesie leczenia, a stężeniem u pozostałych pacjentów. Natomiast stężenie ferrytyny różniło się istotnie w pierwszej i kolejnych remisjach choroby, było również zależne od czasu od diagnozy do transplantacji, co jest zwykle wykładnikiem zwiększonego zapotrzebowania na preparaty KKCz w dłuższym procesie leczenia.

Analizując potransplantacyjne stężenie ferrytyny i wzrost jej stężenia w trakcie procedury stwierdziłam korelację obu parametrów z najwyższym zanotowanym w trakcie procedury aloSCT stężeniem CRP. Podobnie jak w przypadku przedtransplantacyjnym stężenie ferrytyny oznaczane w 30 dobie było skorelowane z ilością przetoczonych jednostek KKCz w tym okresie ($p = 0,002$),

co wskazuje na związek ferrytyny w dobie 30 zarówno z potransfuzyjnym obciążeniem żelazem, jak i procesem zapalnym. Związek stężenia ferrytyny w 30 dobie po transplantacji z żelazem gromadzonym w tkankach potwierdzono także istotną korelacją tego białka z ferrytyną przed przeszczepem komórek macierzystych. Związku takiego nie wykazywała wartość przyrostu stężenia ferrytyny (odpowiednio 0,47: $p < 0,001$ oraz 0,24; NS). Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że zarówno ferrytyna przed transplantacją jak i w dobie 30 procedury może być dobrym miernikiem stanu gospodarki żelaza i jego przeładowania, zaś przyrost stężenia ferrytyny między okresem przed transplantacyjnym a 30 dobą po przeszczepieniu świadczyć może o procesach zapalnych toczących się w organizmie.

Rozwój metod obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) dał kolejne narzędzia do oceny spichrzenia żelaza przede wszystkim w wątrobie. Wyniki badań MRI wątroby porównywane były z wycinkami histopatologicznymi oceniającymi natężenie gromadzenia pierwiastka w tej tkance, co pozwoliło na wykreślenie krzywej wzorcowej. Istnieje kilka technik MRI, każda z nich wykorzystuje pośrednio ocenę stężenia pierwiastka przez obrazy protonów wody dyfundujących w sąsiedztwie depozytów żelaza tkankowego. [78] W piśmiennictwie, nowe techniki oparte o relaksację poprzeczną gradientu spinu echa $T2^*$ i $R2^*$, są obecnie dominującymi badaniami oceniającymi LIC w różnych wskazaniach. Charakteryzują się, bowiem dobrą specyficznością (80%) i czułością (89%). [44-46, 60, 79] Choć metoda Gandona była pierwszą, która określiła LIC w oparciu o badanie histopatologiczne wątroby, została wyparta przez nowsze sekwencje ze względu na nieznacznie mniejszą czułość wynikającą prawdopodobnie z oceny sygnału wątroby w porównaniu z sygnałem określonym w mięśniach przykręgosłupowych. Zastosowanie oceny MRI, najczęściej z sekwencjami $R2^*$, u chorych po aloSCT było przedmiotem kilku badań, które określiły je, jako przydatne w określeniu LIC w tej populacji chorych. [35, 64, 66]

W obserwowanej grupie chorych badałam stopień korelacji obrazów MRI z innymi czynnikami określającymi gospodarkę żelazową: ferrytyną wyjściową i w dobie 30 transplantacji, różnicą stężeń ferrytyny oraz ilością przetoczonych KKCz. Badanie MRI, ze względu na dostępność oprogramowania wykonano po 30 dobie od aloSCT. Przyjęto założenie, że LIC odpowiada sumarycznemu obciążeniu wątroby żelazem, a ilość przetoczonych jednostek KKCz w trakcie procedury (4,8 j.) nie zmieni istotnie wartości tego wskaźnika. Dane z piśmiennictwa wskazują ponadto, iż spadek stężenia żelaza w wątrobie i ferrytyny po aloSCT jest powolny i postępuje w okresie kilkuletnim (do 5-7 lat), [80-82] a LIC w obrazach T2* zależnych nie zmienia się istotnie do roku po przeszczepieniu.[83] Stwierdziłam, że wszystkie wartości LIC oceniane w poszczególnych sekwencjach MRI były skorelowane dodatnio z ferrytyną przed i po aloSCT, natomiast nie stwierdzono takiej zależności (poza sekwencją Gandona) między obrazami MRI a różnicą stężeń ferrytyny. Wyjątek sekwencji Gandona związany jest najpewniej z kalkulacją w tej metodzie obrazów wątroby względem mięśni przykręgosłupowych, w których mogą zachodzić zmiany obserwowane w procesie zapalnym i które mogą wpływać na intensywność sygnału MRI. Zatem zarówno stężenie ferrytyny, jak i obrazowanie MRI jest podobnym, dobrym miernikiem gromadzenia żelaza w wątrobie oraz zasobów żelaza w całym organizmie.

Wykonano również nowe sekwencje obrazów MRI na licencji firmy Simens (LiverLab) oceniające stężenie żelaza w całej objętości wątroby, oparte również na sekwencjach relaksacji poprzecznej T2* i R2*. W uzyskanych obrazach, u większości pacjentów, szczególnie obciążonych istotnym spichrzeniem pierwiastka, nie udało się uzyskać automatycznego mapowania wątroby, co uniemożliwiło właściwą ocenę stężenia żelaza. Błąd ten może być spowodowany specyfiką pacjentów hematologicznych (skrajnie wysokie wartości LIC, zmiany strukturalne wątroby w okresie potransplantacyjnym). Z tego powodu wydaje się,

że metoda ta wymaga weryfikacji w badaniach innych grup pacjentów, np. z zespołem mielodysplastycznym.

Alogeniczne przeszczepienie komórek macierzystych krwiotworzenia związane jest z dużym ryzykiem śmiertelności niezwiązanej ze wznową choroby zasadniczej (NRM – non relapse mortality) zależnej od powikłań toksycznych i infekcyjnych procedury. Wykazano, że istotny wpływ na niepowodzenie aloSCT ma występowanie chorób współistniejących. Grupa badaczy z Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC) opracowała współczynnik ryzyka specyficzny dla aloSCT oparty na występowaniu zdefiniowanych chorób i zaburzeń klinicznych oraz ich stopniu zaawansowania – HCT-CI (współczynnik chorób współistniejących specyficzny dla SCT). W wielu badaniach potwierdzono korelacje między HCT- CI a śmiertelnością niezwiązaną ze wznową i przeżyciem ogólnym chorych (OS) poddanych alo – i autoSCT w różnych wskazaniach hematologicznych. [84-88]. Kolejne obserwacje potwierdziły, że istnieją inne dodatkowe i niezależne czynniki prognostyczne przebiegu SCT i zwiększonego ryzyka NRM. Jednym z nich jest hiperferrytynemia obecna przed procedurą. [89] Grupa FHCRC podjęła próbę oceny ferrytyny, jako niezależnego czynnika prognostycznego stwierdzając jego istotny wpływ na przebieg transplantacji, głównie NRM 9punkt odcięcia ferrytyny >2500 mg/dl). Stwierdzono jednocześnie, że inkorporacja ferrytyny, jako składowej ogólnego współczynnika ryzyka aloSCT może poprawiać wartość predykcyjną HCT-CI. [90] W badaniu Kataoka i wsp. [91] wykazano istotny niekorzystny wpływ hiperferrytynemii przedtransplantacyjnej na ogólne przeżycie i czas wolny od progresji choroby, bez względu na rodzaj zastosowanego kondycjonowania (mieloablacyjne i o zredukowanej toksyczności). Część badaczy podważała ten wniosek wskazując, że wysokie stężenie ferrytyny przed aloSCT może być wynikiem nie tylko przeładowania organizmu żelazem,[90] ale może wynikać również z obecności ukrytej infekcji czy zapalenia w wyniku uszkodzenia tkanek. W prospektywnym badaniu

Wermeke i wsp. podjęli próbę zobiektywizowania wyników i wykazali istotny wpływ przeładowania organizmu żelazem wyrażonego, jako podwyższone stężenie żelaza wątrobowego LIC > 125 $\mu\text{mol/g}$ sm u osób poddanych mieloablacyjnemu aloSCT z powodu ostrej białaczki lub zespołu mielodysplastycznego, na obniżenie całkowitego przeżycia.[92] Pojedyncze, nowe doniesienia nie potwierdzają jednak tezy, że wartość LIC, wyrażająca gromadzenie tego pierwiastka w ustroju ma wpływ na ogólne przeżycie, NRM, czy czas wolny od choroby po aloSCT. [38, 83]

Poza oceną wpływu nadmiaru żelaza na współczynniki przeżycia, większość autorów odnosiła się do związku przeładowania organizmu tym pierwiastkiem z występowaniem różnych powikłań transplantacyjnych. Jednak uzyskiwane wyniki były sprzeczne.

Potencjalny wpływ żelaza, zgodnie ze zdobytą wiedzą, na możliwość wystąpienia zwiększonego ryzyka powikłań infekcyjnych i toksyczności narządowej, wyraża się szczególnie we wczesnym okresie aloSCT. Wówczas, w przeciwieństwie do obserwacji po 100 dobie, większość chorych prezentuje jednakowe parametry (niedobór odporności, leczenie immunosupresyjne, pancytopenia, czy możliwa toksyczność jednolitych leków, chemioterapeutyków), dlatego nadmiar żelaza może odgrywać istotną rolę regulującą przebieg infekcji, czy nasilającą działania uboczne procedur leczniczych. Z tego powodu w mojej pracy wybrałam okres pierwszych 30 dni aloSCT, jako czas obserwacji chorych.

Podstawy teoretyczne wiedzy o wpływie żelaza na funkcje komórkowe, ich proliferację, przeżycie, a nade wszystko na promocję patogenów infekcyjnych i regulację układu immunologicznego, pozwalają spodziewać się wpływu zarówno niedoboru, jak i nadmiaru tego pierwiastka na rozwój powikłań transplantacyjnych o charakterze infekcyjnym. Dostępność żelaza może wydawać się kluczowym czynnikiem regulującym wzrost patogenów we wczesnym okresie aloSCT. Przy nadmiernej podaży żelaza powikłania

infekcyjne mogą stanowić istotny czynnik zwiększonej śmiertelności.[93] W grupie chorych z wysoką ferrytynemią, badanym przez Kataoka i wsp. NRM związana była przede wszystkim z incydentami infekcyjnymi i niewydolnością narządową i istotnie wyższa w porównaniu z grupą z niskim stężeniem białka.[91] W badaniu tym punkt odcięcia dla stężenia ferrytyny był niski [599 ng/ml]. Podobne wyniki uzyskali Altes i wsp.,[75] którzy stwierdzili, że stężenie ferrytyny powyżej 3000 ug/l korelowało negatywnie z OS i śmiertelnością związaną z transplantacją (transplant related mortality – TRM). TRM było związane ze zwiększonym występowaniem ciężkich powikłań infekcyjnych w grupie wysokiego stężenia ferrytyny. Podobne wyniki uzyskałam w przeprowadzonych badaniach. Stężenie ferrytyny było istotnie wyższe u pacjentów z najwyższą wartością skumulowanego współczynnika wystąpienia wszystkich infekcji (OWI). Szczególnie silnie wyrażona była różnica między grupą w której zanotowano pojedynczą infekcję bakteryjną (OWI-1) i grupą w której pacjenci dotknięci byli infekcjami o etiologii mieszanej patogenami bakteryjnymi, wirusowymi i grzybiczymi (OWI-3; p=0,04). Istotnie częściej występowały zakażenia cięższe (OWCI-1) przy wyższych stężeniach ferrytyny przedtransplantacyjnej w stosunku do zakażeń lżejszych (p=0,04). Podobne wyniki uzyskano w obrazowaniu MRI metodą Gandona. Pozostałe sekwencje nie wykazywały związku wysokiego LIC z wystąpieniem wczesnych infekcji związanych z aloSCT, Wyniki badań LIC w sekwencjach T2* i R2* pozostają w zbieżności z obserwacjami Trotter i Armanda, którzy nie stwierdzili związku LIC z występowaniem infekcji.[38, 83]

Wyniki analizy oceniającej zależność wysokich stężeń ferrytyny i LIC z występowaniem zakażeń o określonej etiologii przyniosły zaskakujące rezultaty. Nie stwierdzono istotnie częstszego występowania infekcji bakteryjnych u pacjentów z wysokimi stężeniami ferrytyny i LIC. Stan przeładowania żelazem nie miał też związku z ciężkością infekcji bakteryjnych. Stwierdzono natomiast istotną zależność między wysokim stężeniem ferrytyny a występowaniem

infekcji wirusowych i grzybiczych. Taką samą zależność uzyskano przy zastosowaniu oceny LIC metodą Gandona, ale nie w innych sekwencjach MRI. Potwierdzona siderofilność niektórych szczepów bakterii mogła sugerować, że stany obciążenia żelazem będą sprzyjać rozwojowi tego typu powikłań. Kanda i wsp. wykazali, że u pacjentów z wysokim stężeniem ferrytyny [punkt odcięcia ≥ 700 ng/ml] [94] zakażenia występowały 4 krotnie częściej niż w grupie chorych z niższymi wartościami tego parametru, a zgony z powodu ciężkich powikłań infekcyjnych wystąpiły jedynie u chorych ze skrajnie wysoką ferrytyną przedtransplantacyjną. W badaniach *in vitro* z surowicą chorych poddanych aloSCT wykazano, że wysokie stężenie NTBI indukowało proliferację *Staphylococcus epidermidis*, zaś dodanie apotransferyny wywierało działanie hamujące.[95] Natomiast Altes i wsp., a także Maertens i wsp. opisali korelację zwiększonej podaży żelaza w organizmie z występowaniem aspergilozy i mucormycyzy u chorych poddanych aloSCT, co pozostaje w zgodzie z obserwacją własną. [65, 96] Brak jest natomiast prac poświęconych infekcjom wirusowym i wpływu gospodarki żelazowej na ich rozwój i przebieg w grupie chorych poddanych aloSCT. W badaniach poświęconych wirusowi HIV czy HCV stwierdzono jedynie, że podobnie do innych patogenów również te wirusy wymagają podaży żelaza do właściwej proliferacji, dlatego zwiększona podaż pierwiastka w komórkach gospodarza sprzyja rozwojowi zakażenia.[97, 98] Podobne patomechanizmy mogą odgrywać rolę także w przypadku reaktywacji wirusów u biorców aloSCT w stanach przeładowania żelazem. Brak zależności LIC w sekwencjach MRI T2* i R2* zależnych i zakażeń pozostaje w zgodzie z badaniem Trottiera i wsp., [38] którzy nie stwierdzili związku żelaza gromadzonego w wątrobie z różnymi rodzajami zakażeń. Odmiennosc obserwacji dotyczących LIC może wynikać z faktu, że choć oba parametry: ferrytyna i MRI T2*, R2*, odnoszą się do obciążeniem żelazem organizmu, to obejmują inną pulę pierwiastka.

Zaburzenia gospodarki żelazowej poza bezpośrednim wpływem promującym czynniki zakaźne mogą wywierać również wpływ na układ odpornościowy wrodzony i nabyty. Istnieją doniesienia o zaburzeniach funkcji i ilości komórek układu immunologicznego, zaburzeniach chemotaksji i fagocytozy granulocytów w stanach nadmiernej podaży żelaza. [99] W analizach własnych nie stwierdziłam u żadnego z badanych pacjentów odchyleń od normy w badaniach stymulacji fagocytozy. Badanie było przeprowadzone w okresie regeneracji hematopoezy, w chwili uzyskania liczby granulocytów w zakresie 0,5-1,0 G/l. Nie można wykluczyć, że zaburzenia takie występują po dłuższej ekspozycji komórek na nadmierną podaż żelaza i badanie należało powtórzyć w późniejszym okresie potransplantacyjnym.

Chemioterapia i radioterapia kondycjonująca wywiera toksyczne działanie nie tylko na komórki patologiczne, ale również na tkanki zdrowe. We wczesnym okresie procedury transplantacyjnej stwierdzono istotny, nagły wzrost stężenia żelaza uwolnionego z uszkodzanych komórek oraz wzrost NTBI odwrotnie korelujący z aktywnością antyoksydacyjną osocza.[100-102] Środowisko takie sprzyja generowaniu wolnych rodników tlenowych [ROS] pod wpływem żelaza niezwiązanego, co nasila niekorzystne działanie radio- i chemioterapii. W przypadku stanu nadmiernego obciążenia organizmu tym pierwiastkiem spodziewane uszkodzenia mogą być istotne klinicznie.[103] Każda tkanka charakteryzuje się różną wrażliwością na działanie toksyczne żelaza. Wątroba, która stanowi jego magazyn powinna być szczególnie narażona, co może przejawiać się uszkodzeniem hepatocytów lub specyficznym dla aloSCT zespołem uszkodzenia komórek wątrobowych i śródbłonek zatok [VOD]. Tezę tą poparto tylko w badaniach, [77, 92, 104] w których stwierdzono zależność częstości występowania obu powikłań od hiperferrytynemii, natomiast badania wykorzystujące LIC MRI, jako miarę obciążenia żelazem, nie wykazały takiego związku. [38, 83] Armand sugerował, iż różnice w ocenie związku powikłań toksycznych ze statusem żelaza ustrojowego mogą wynikać z niższej

specyficzności ferrytyny niż technik MRI. W badaniach własnych nie wykazano zależności powikłań toksycznych, ani od LIC MRI, ani od hiperferrytnemii. Grupa badana oraz ilość powikłań mogły być jednak zbyt małe do zaobserwowania zależności.

Prawdopodobnie identyczny jak w VOD, patomechanizm uszkodzeń komórek śródbłonna naczyń całego organizmu jest podłożem bardzo rzadkich i trudnych do rozpoznania powikłań mikroangiopatycznych, np. HUS, TAM, TTP. Również w tym przypadku nie stwierdzono zwiększonego ryzyka wystąpienia patologii, co sugerowałoby rzeczywisty brak korelacji między stanem przeładowania żelazem a powikłaniami nieinfekcyjnymi. Brak jest w literaturze analiz dotyczących tego zagadnienia.

Ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi zaliczana jest do powikłań nieinfekcyjnych mających istotny wpływ na NRM w aloSCT. Pomimo, że hiperferrytnemia wiązała się ze zwiększoną ilością powikłań mających wpływ na NRM, w badaniu Kataoka nie stwierdzono zwiększonego ryzyka wystąpienia aGvHD w grupie ze zwiększonym stężeniem ferrytyn,[91] co potwierdzili inni badacze także w badaniach z zastosowaniem MRI. [38] Obserwacje własne pozostają zbieżne z wynikami wymienionych analiz.

Nadmierne spichrzenie żelaza w populacji chorych poddawanych alogenicznemu przeszczepieniu hematopoetycznych komórek progenitorowych jest często obserwowaną patologią, która może mieć istotny wpływ na powodzenie zastosowanej terapii. W piśmiennictwie polskim nie znalazłam do tej pory doniesień poświęconych tematyce spichrzenia żelaza w kontekście aloSCT, a jedynie pojedyncze prace oceniające to zjawisko w chorobach wątroby. [105] Dostępne dane literaturowe są niejednoznaczne, czasem sprzeczne, opisujące korelację wyników i powikłań przeszczepienia najczęściej tylko z jedną metodą oceny nadmiernej podaży żelaza. Zaletą owego badania jest próba oceny zagadnienia w zależności od większej ilości dostępnych metod. (hiperferrytnemii oraz 3 sekwencji MRI). Wyniki badań własnych wskazują na

brak korelacji między stanami obciążenia żelazem a występowaniem powikłań nieinfekcyjnych procedury aloSCT. Stwierdzono natomiast związek hiperferrytynemii i wysokiego LIC ocenianego MRI metodą Gandona na częstość występowania powikłań infekcyjnych - grzybiczych i wirusowych oraz na współwystępowanie zakażeń o różnej etiologii i w stopniu ciężkim. Interesujące jest, że spójne wyniki uzyskano w ocenie stężenia ferrytyny i LIC w metodzie Gandona. Możliwe, iż charakter metodyki tych badań może opisywać nadmierne gromadzenie żelaza nie tylko ograniczające się do magazynów wątrobowych i dlatego mogą być bardziej przydatne praktycznie w przewidywaniu przebiegu transplantacji. Ponad to, uzasadnionym wydaje się być stwierdzenie, że ocena MRI nie wnosi dodatkowej wartości predykcyjnej.

6. WNIOSKI

1. Stężenie ferrytyny i badanie LIC poprzez obrazy MRI metodą Gandona, sekwencjami multiechowymi T2* R2* są porównywalnymi, skorelowanymi metodami oceny spichrzenia żelaza i w porównywalnym zakresie wykazują korelację z przetoczeniami koncentratów krwinek czerwonych.

2. U pacjentów z wysokim przedtransplantacyjnym stężeniem ferrytyny oraz wysokimi wartościami LIC ocenianymi w MRI metodą Gandona stwierdzono:
 - a/ większą częstość występowania infekcji grzybiczych i wirusowych we wczesnym okresie po transplantacji.
 - b/ większą częstość zakażeń wieloma patogenami i cięższy przebieg infekcji
 - c/ nie stwierdzono związku między występowaniem powikłań nieinfekcyjnych po transplantacji a stanem przeładowania żelazem w żadnej z metod oceny.

3. Nie stwierdzono wpływu spichrzenia żelaza na występowanie i ciężkość ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

7. STRESZCZENIE

Alotransplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych jest jedną z metod terapeutycznych stosowanych w leczeniu chorób hematologicznych głównie związanych z nowotworowym rozrostem macierzystej komórki krwiotwórczej, rzadziej przeprowadzana z powodu wrodzonych i nabytych chorób nienowotworowych szpiku kostnego i układu limfatycznego. Podczas każdego z etapów tego procesu terapeutycznego występują swoiste powikłania o różnym stopniu nasilenia mogące być przyczyną przejściowego lub trwałego upośledzenia zdrowia biorcy, jak również niepowodzenia leczenia. We wczesnym okresie potransplantacyjnym najczęstszym powikłaniem, które wciąż, mimo postępu diagnostycznego i terapeutycznego, odpowiedzialne są za istotną śmiertelność związaną z procedurą, są infekcje o różnej etiologii. Innym rodzajem zaburzeń, mogącym wystąpić w okresie regeneracji hematopoezy, są powikłania toksyczne takie jak: mucositis, uszkodzenie mięszu wątroby, specyficzna dla procedury choroba wenookluzyjna wątroby, czy liczne zaburzenia związane z mikroangiopatią, a po wszczępieniu również ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Oba rodzaje powikłań, infekcyjne i nieinfekcyjne, zależą od czynników samej procedury transplantacji, głównie od zastosowanych schematów postępowania kondycjonującego, jak i od czynników zależnych od biorcy, takich jak stan ogólny i choroby współistniejące. W piśmiennictwie zwraca się również uwagę na możliwość negatywnego przebiegu transplantacji w przypadku nadmiernego gromadzenia żelaza w organizmie, choć dane na ten temat nie są spójne.

Metabolizm żelaza jest niezmiernie skomplikowanym procesem fizjologicznym. W ostatnich dekadach udało się poznać procesy odpowiedzialne za homeostazę pierwiastka, jak również wielorakie funkcje życiowe. Nie dziwi, zatem fakt, iż żelazo to jeden z najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków wśród niemal wszystkich organizmów żywych. Z powodu swojej natury żelazo

charakteryzuje się także negatywnym oddziaływaniem na tkanki, co może szczególnie wystąpić w przypadku jego nadmiernej podaży. Pacjenci poddawani transplantacji, z powodu wcześniej stosowanej terapii (chemioterapia, toksyczność narządowa, a przede wszystkim przetoczenia koncentratów krwinek czerwonych) narażeni są przed zabiegiem i podczas całej procedury transplantacyjnej na istotne zaburzenia gospodarki żelazowej ustroju. Ocena zaburzeń ilości ogólnoustrojowej żelaza oparta jest o wiele metod o różnej specyficzności i czułości a powszechnie uznane standardowe histopatologiczne badanie oceniające stężenie żelaza w wątrobie nie zawsze może być przeprowadzone u chorych po transplantacji komórek macierzystych krwiotworzenia.

Rozpowszechnienia przeładowania organizmu żelazem wśród pacjentów poddawanych alotransplantacji komórek krwiotwórczych jest dość istotne, dlatego celem pracy było ustalenie najlepszej metody opisującej stan przeładowania pierwiastkiem. W tym celu zgromadzono wyniki badań gospodarki żelazowej rutynowo ocenianej w stałych punktach czasowych procedury transplantacyjnej, prześledzono narażenie chorych na nagromadzenie żelaza przed procedurą, głównie poprzez przetoczenia koncentratów krwinek czerwonych i wykonano badanie obrazowe rezonansu magnetycznego w różnych sekwencjach opisanych w literaturze dedykowanych diagnostyce spichrzenia żelaza. Podjęto również próbę skorelowania ewentualnych wskaźników opisujących gospodarkę żelazową z najczęstszymi powikłaniami infekcyjnymi i nieinfekcyjnymi występującymi we wczesnym okresie po przeszczepieniu, w którym to czasie żelazo może odgrywać istotną rolę etiopatologiczną. Retrospektywnie zgromadzono dane dotyczące infekcji oraz powikłań nieinfekcyjnych z oceną kliniczną i laboratoryjną poszczególnych zaburzeń, które wystąpiły w czasie 30 pierwszych dni od transplantacji oraz oceniono stopień ciężkości każdego z nich. Wyznaczono również skorelowane

współczynniki infekcji i ich ciężkości. Wszystkie dane poddano ocenie i korelacji ze stanem gospodarki żelaza.

Badaniem objęto 45 chorych po alotransplantacji hematopoetycznych komórek progenitorowych, leczonych w Klinice Hematologii i Transplantologii w latach 2015-2016, u których wykonano obrazowanie rezonansem magnetycznym jamy brzusznej. Grupę badaną stanowili w większości mężczyźni, z rozpoznaniem ostrej białaczki z istotnym narażeniem na spichrzenie żelaza.

Na podstawie wyników badania stwierdzono, iż przeładowanie żelazem chorych kwalifikowanych do alotransplantacji komórek macierzystych krwiotworzenia jest zjawiskiem często występującym w umiarkowanym i istotnym nasileniu. Badania ferrytyny i obrazowania rezonansem magnetycznym w sekwencjach Gandona, multiechowych T2* i R2* są dobrymi parametrami wskazującymi stan nadmiernej kumulacji żelaza w ustroju chorych, zależnymi od licznych przetoczeń KKCz. Natomiast zaburzenia gospodarki żelaza nie wpływają na większość powikłań nieinfekcyjnych i infekcyjnych oraz ostrą postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Stwierdzono jedynie istotnie statystycznie większą częstość powikłań grzybiczych i wirusowych. Chorzy z nadmiernym gromadzeniem, żelaza charakteryzowali się ponad to częstszym występowaniem infekcji współistniejących i nakładających się na siebie, o cięższym przebiegu klinicznym.

Sprzeczności literaturowe dostępnych wyników badań, co do wpływu przeładowania ustroju żelazem na przebieg alogenicznej transplantacji komórek macierzystych, nie zostały w niniejszym badaniu rozwiane. Istotną wydaje się, zatem dalsza ich obserwacja i prospektywne badania czy deregulacja homeostazy żelaza i jej stopień ma wpływ na przebieg i ciężkość powikłań infekcyjnych i toksycznych aloSCT, co może mieć wpływ na śmiertelność okołotransplantacyjną.

8. SUMMARY

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is one of therapeutic methods applied in the treatment of haematological diseases, related mainly to neoplastic proliferation of a haematopoietic stem cell or, less frequently, to congenital and non-contracted non-malignant disorders of the bone marrow and the lymphatic system. During each stage of the therapeutic process, specific complications of varying degrees of severity can occur and impair, temporarily or permanently, the health of the transplant recipient or result in the treatment's failure. At the early post-transplantation stage, the most common complications, which are still responsible for the surgery's high death rate, despite the diagnostic and therapeutic progress, are infections of varying aetiology. Other types of disorders that can occur during the period of haematopoiesis regeneration are toxic complications, such as mucositis, damaged liver parenchyma, which is a veno-occlusive disease of the liver that is specific to treatment, and various disorders related to microangiopathy. After the transplantation surgery, there is also the risk of the graft-versus-host disease. Both types of complications, infectious and non-infectious ones, depend mainly on conditions of the transplantation itself, mainly on the conditioning treatment carried out as well as the recipient-dependant factors, such as the patient's general health condition and co-morbidities. Literature from the field also indicates that transplantation of hematopoietic stem cells can result in a failure in the case of excessive accumulation of iron in the body; however, data on the subject are not consistent.

Iron metabolism is an extremely complicated physiological process. During the last few decades, we have managed to learn about the processes responsible for iron homeostasis as well as for various vital functions. Thus, it comes as no surprise that iron is one of the most widely spread elements among almost all living organisms. Due to its nature, iron has a negative influence on tissues,

especially if it is consumed in excess. Patients undergoing transplantation are under the threat of significant disturbances of the body's iron homeostasis before and during the entire transplantation because of the preceding treatment applied [chemotherapy, organ toxicity, and above all, transfusions of packed red blood cells]. Assessments carried out in order to establish if there are any disruptions concerning iron homeostasis in the system are based on numerous methods of different specificity and sensitivity, while the generally recognised standard histopathologic examination, allowing for determination of the iron's concentration in the liver, cannot always be carried out in case of patients who underwent transplantation of haematopoietic stem cells.

The aim of the paper was to establish prevalence of the body's overload with iron among patients who have undergone allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and to identify the best method to describe the state of the iron overload. In order to do so, results of examination of iron homeostasis, which is routinely assessed at specific time points during a transplantation surgery, were collected; the risk that a patient will accumulate iron in his/her body before the procedure, mainly due to transfusions of packed red blood cells, was assessed, and a magnetic resonance examination was carried out in different sequences described in the literature on the diagnosis of iron storage diseases. An attempt was also made to find a correlation between potential indicators of the iron homeostasis and the most frequent infectious and non-infectious complications occurring at an early stage after transplantation. Data concerning infections and non-infectious complications, together with clinical and laboratory evaluations of each of the disorders that occurred within the 30 first days from the transplantation surgery, were collected retrospectively and the severity of each of them was assessed. Correlation coefficients of infections and their severity were established. All data were subjected to evaluation, and their correlation with the iron homeostasis was established.

The study covered 45 patients who underwent allogenic transplantation of haematopoietic precursor cells, were treated in the Clinic for Haematology and Transplants between 2015 and 2016, and whose abdominal cavities were subjected to magnetic resonance imaging (MRI). The studied group consisted mainly of men with diagnosed acute leukaemia and who were at risk of the iron storage disease.

On the basis of the results of the study, it was found that iron overload in patients qualified for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a phenomenon occurring frequently at moderate and significant severity. Ferritin examination and magnetic resonance imaging using Gandon's multi-echo sequences T2* and R2* are good parameters indicating the state of overaccumulation of iron in the patient's system, which can be caused by numerous transfusions of packed red blood cells. However, disruptions of the iron homeostasis do not have an influence on the majority of non-infectious and infectious complications nor the acute type of the graft-versus-host disease. It was only found that the frequency of fungal and viral complications was statistically higher. Patients with an overload of iron were characterised by more frequent co-existing and overlapping infections with more severe clinical symptoms.

Inconsistencies in the results of available studies on the influence of the systematic iron overload on the course of allogenic transplantation of stem cells was not explained in the paper. Thus, it seems that further observations and prospective studies are required to establish if deregulation of the iron homeostasis has an influence (and to what extent) on the course and severity of infectious and toxic complications of alloSCT, which could contribute the death rate related to transplantations.

9. SPIS TABEL

| | |
|---|----|
| <i>Tabela 1 Stany przeładowania żelazem. [21, 22]</i> | 17 |
| <i>Tabela 2 Dane demograficzne 45 pacjentów poddanych analizie. *Dane po wykluczeniu z analizy chorej ze skrajnie odbiegającym od średniej okresem od rozpoznania do transplantacji.</i> | 33 |
| <i>Tabela 3 Dane schematu procedury aloSCT 45 pacjentów poddanych analizie.</i> | 34 |
| <i>Tabela 4 Skala sprawności ECOG - WHO.</i> | 39 |
| <i>Tabela 5 Wybrane parametry wątrobowe skali CTCAE, wersja 4.0.</i> | 42 |
| <i>Tabela 6 Stopień ciężkości VOD. GGN – górna granica normy. [50]</i> | 43 |
| <i>Tabela 7 Stopień ciężkości objawów aGvHD specyficzny dla poszczególnych narządów.</i> | 44 |
| <i>Tabela 8 Stopień ciężkości aGvHD wg Glucksberga.</i> | 45 |
| <i>Tabela 9 Stężenie ferrytyny w ng/ml w populacji 45 chorych przed aloSCT.</i> | 47 |
| <i>Tabela 10 Średnia podaż KKCz, średnie stężenie Hgb i CRP w populacji 45 chorych przed aloSCT.</i> | 50 |
| <i>Tabela 11 Korelacja stężenia ferrytyny przed aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz, stężeniem hemoglobiny i CRP.</i> | 51 |
| <i>Tabela 12 Stężenie ferrytyny w ng/ml w 30 dobie aloSCT i jej przyrost w stosunku do parametrów wyjściowych w obserwowanej populacji 45 chorych. *Wartość granicznie nieistotna statystycznie [p=0,05].</i> | 53 |
| <i>Tabela 13 Współczynnik korelacji stężenia ferrytyny i przyrostu jej stężenia w 30 dobie po aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz i stężeniem ferrytyny przed procedurą.</i> | 54 |
| <i>Tabela 14 Korelacja obrazów MRI w różnych sekwencjach z ilością przetoczonych jednostek KKCz, stężeniem ferrytyny i CRP w zdefiniowanych wcześniej punktach czasowych procedury.</i> | 57 |
| <i>Tabela 15 Rozkład ciężkości zakażeń wirusowych i grzybiczych wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | 58 |
| <i>Tabela 16 Wskaźnik OWI i OWCI wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | 60 |
| <i>Tabela 17 Zależność między stężeniem żelaza w wątrobie w różnych sekwencjach obrazu MRI a wystąpieniem powikłań infekcyjnych wśród 44 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | 63 |
| <i>Tabela 18 Powikłania nieinfekcyjne, ich częstość i ciężkość wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | 66 |

10. SPIS RYCIN

| | |
|--|----|
| Rycina 1 Zawartość żelaza w organizmie, jego przepływ i regulacja hepcydyną.[1] Ganz, T., Systemic iron homeostasis. <i>Physiol Rev</i> , 2013. 93 (4): p. 1721-41. Modyfikacja własna. | 7 |
| Rycina 2 Proces komórkowego wchłaniania, transportu i magazynowania żelaza. [5] Hentze, M.W., et al., Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. <i>Cell</i> , 2010. 142 (1): p. 24-38. Modyfikacja własna. | 9 |
| Rycina 3 Czynniki stymulujące i hamujące syntezę i wydzielanie hepcydyny. [1] Ganz, T., Systemic iron homeostasis. <i>Physiol Rev</i> , 2013. 93 (4): p. 1721-41. | 11 |
| Rycina 4 Reakcja Fentona (b) i Habera – Weissa (c)..... | 14 |
| Rycina 5 Zależność współczynnika sygnału wątroba/mięśnie w zależności od stężenia żelaza w g suchej masy tkanki wątrobowej w badaniu histopatologicznym.[45] „Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI” Gandon Y. <i>Lancete</i> 2004. | 24 |
| Rycina 6 Zależność współczynnika sygnału R2 w zależności od stężenia żelaza w g suchej masy tkanki wątrobowej w badaniu histopatologicznym. [46] „Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance.” G. St. Pierre T. <i>Transfusion medicine</i> 2005. | 24 |
| Rycina 7 Szczegółowe rozpoznania wśród pacjentów poddanych analizie z diagnozą ostrej białaczki.(AL – ostra białaczka, ALL – ostra białaczka limfoblastyczna, AML – ostra białaczka szpikowa). | 31 |
| Rycina 8 Szczegółowe rozpoznania wśród pacjentów poddanych analizie z diagnozą inną niż ostra białaczka (CLL – przewlekła białaczka limfocytowa, CML – przewlekła białaczka szpikowa, MDS – zespół mielodysplastyczny, MPN – przewlekły nowotwór mieloproliferacyjny, SAA – anemia aplastyczna)..... | 32 |
| Rycina 9 Kalkulator medyczny on-line – żelazo, wątroba i MRI. Yves Gandon. | 36 |
| Rycina 10 Rozkład stężenia ferrytyny przed aloSCT u 45 chorych poddanych obserwacji..... | 48 |
| Rycina 11 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w dwóch grupach diagnostycznych: 1 – chorzy z rozpoznaniem ostrej białaczki [AL.], 2 – chorzy z innymi rozpoznaniemami. | 49 |
| Rycina 12 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie (CR1 – pierwsza całkowita remisja, CR>1 – kolejne remisje, NR – brak remisji)..... | 49 |
| Rycina 13 Stężenie ferrytyny przed aloSCT w dwóch grupach chorych w zależności od czasu od rozpoznania do transplantacji..... | 50 |
| Rycina 14 Korelacja stężenia ferrytyny przed aloSCT z ilością przetoczonych jednostek KKCz od chwili rozpoznania do momentu transplantacji u 45 chorych..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Rycina 15 Korelacja ferrytyny przed aloSCT ze stężeniem CRP przed aloSCT u 45 chorych badanej populacji.</i> | <i>52</i> |
| <i>Rycina 16 Korelacja ferrytyny z ilością przetoczonych KKCz w okresie procedury aloSCT u 43 chorych poddanych obserwacji. Dane po usunięciu danych odstających.</i> | <i>55</i> |
| <i>Rycina 17 Występowanie zakażeń wirusowych w zależności od ferrytyny przed aloSCT wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | <i>59</i> |
| <i>Rycina 18 Występowanie zakażeń grzybiczych w zależności od ferrytyny wyjściowej wśród 45 chorych do 30 doby aloSCT.</i> | <i>60</i> |
| <i>Rycina 19 Zależność wskaźnika OWI od stężenia ferrytyny przedtransplantacyjnej u 45 chorych po aloSCT.</i> | <i>61</i> |
| <i>Rycina 20 Zależność wskaźnika OWCI od stężenia ferrytyny przed aloSCT u 45 obserwowanych chorych.</i> | <i>62</i> |
| <i>Rycina 21 Zależność wskaźnika OWI od stężenia żelaza w wątrobie w sekwencji Gandona u 44 chorych po aloSCT.</i> | <i>64</i> |
| <i>Rycina 22 Zależność wskaźnika OWCI od stężenia żelaza w wątrobie w sekwencji Gandona u 44 chorych po aloSCT.</i> | <i>64</i> |

11. PIŚMIENICTWO

1. Ganz, T., *Systemic iron homeostasis*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(4): p. 1721-41.
2. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a011668.
3. Zimmermann, M.B. and R.F. Hurrell, *Nutritional iron deficiency*. *Lancet*, 2007. **370**(9586): p. 511-20.
4. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. *Cell*, 2004. **117**(3): p. 285-97.
5. Hentze, M.W., et al., *Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism*. *Cell*, 2010. **142**(1): p. 24-38.
6. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
7. Adamsky, K., et al., *Decreased hepcidin mRNA expression in thalassemic mice*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(1): p. 123-4.
8. Gardenghi, S., R.W. Grady, and S. Rivella, *Anemia, ineffective erythropoiesis, and hepcidin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in beta-thalassemia*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010. **24**(6): p. 1089-107.
9. Lill, R., *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. *Nature*, 2009. **460**(7257): p. 831-8.
10. Rouault, T.A., *Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(1): p. 45-55.
11. Ward, R.J., et al., *Iron and the immune system*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2011. **118**(3): p. 315-28.
12. Cassat, J.E. and E.P. Skaar, *Iron in infection and immunity*. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(5): p. 509-19.
13. Crichton, R.R., et al., *Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells*. *J Inorg Biochem*, 2002. **91**(1): p. 9-18.
14. Masson, P.L., J.F. Heremans, and E. Schonke, *Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes*. *J Exp Med*, 1969. **130**(3): p. 643-58.
15. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. *FEBS Lett*, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
16. Peyssonnaud, C., et al., *TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens*. *Blood*, 2006. **107**(9): p. 3727-32.

17. Nairz, M., et al., *Lipocalin-2 ensures host defense against Salmonella Typhimurium by controlling macrophage iron homeostasis and immune response*. Eur J Immunol, 2015. **45**(11): p. 3073-86.
18. Santos, P.C. and R.P. Falcao, *Decreased lymphocyte subsets and K-cell activity in iron deficiency anemia*. Acta Haematol, 1990. **84**(3): p. 118-21.
19. Luraschi, A., et al., *[Determination of lymphocyte subpopulations, defined with monoclonal antibodies, in patients with iron deficiency anemia]*. Minerva Med, 1991. **82**(9): p. 557-63.
20. Matsui, K., et al., *Iron Overload Effects On Immune System Through The Cytokine Secretion By Macrophage*. Blood, 2013. **122**(21).
21. Zoller, H. and B. Henninger, *Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Hemochromatosis*. Dig Dis, 2016. **34**(4): p. 364-73.
22. Pietrangelo, A., *Iron and the liver*. Liver Int, 2016. **36 Suppl 1**: p. 116-23.
23. Pietrangelo, A., *Genetics, Genetic Testing, and Management of Hemochromatosis: 15 Years Since Hfe*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1240-1251 e4.
24. Recalcati, S., et al., *New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity*. J Autoimmun, 2008. **30**(1-2): p. 84-9.
25. Watt, R.K., *The many faces of the octahedral ferritin protein*. Biometals, 2011. **24**(3): p. 489-500.
26. Nairz, M., et al., *Iron at the interface of immunity and infection*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 152.
27. Oppenheimer, S.J., *Iron and its relation to immunity and infectious disease*. J Nutr, 2001. **131**(2S-2): p. 616S-633S; discussion 633S-635S.
28. Drakesmith, H. and A.M. Prentice, *Hfe and the iron-infection axis*. Science, 2012. **338**(6108): p. 768-72.
29. Gozzelino, R. and P. Arosio, *Iron Homeostasis in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
30. Michels, K., et al., *Hfe and Host Defense against Infectious Diseases*. PLoS Pathog, 2015. **11**(8): p. e1004998.
31. De Domenico, I., et al., *Hfe mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2395-405.
32. Huang, Y.H., et al., *Hfe protects against lipopolysaccharide-induced liver injury in a mouse model of obstructive jaundice*. Peptides, 2012. **35**(2): p. 212-7.
33. Kullberg, B.J. and J.W. van 't Wout, *[Invasive zygomycosis: notably in diabetes mellitus and iron overload]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2007. **151**(47): p. 2603-5.
34. Alvarez, F., M. Fernandez-Ruiz, and J.M. Aguado, *[Iron and invasive fungal infection]*. Rev Iberoam Micol, 2013. **30**(4): p. 217-25.

35. Majhail, N.S., H.M. Lazarus, and L.J. Burns, *Iron overload in hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(12): p. 997-1003.
36. Atilla, E., et al., *Current Review Of Iron Overload And Related Complications In Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Turk J Haematol, 2016.
37. Alexander, J., et al., *Association of hepatic iron overload with invasive fungal infection in liver transplant recipients*. Liver Transpl, 2006. **12**(12): p. 1799-804.
38. Trottier, B.J., et al., *Association of iron overload with allogeneic hematopoietic cell transplantation outcomes: a prospective cohort study using R2-MRI-measured liver iron content*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1678-84.
39. Zhang, Y., et al., *Effects of iron overload on the bone marrow microenvironment in mice*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120219.
40. Ibrahim, E.H., A.M. Khalifa, and A.K. Eldaly, *MRI T2* imaging for assessment of liver iron overload: study of different data analysis approaches*. Acta Radiol, 2016.
41. Quinn, C.T. and T.G. St Pierre, *MRI Measurements of Iron Load in Transfusion-Dependent Patients: Implementation, Challenges, and Pitfalls*. Pediatr Blood Cancer, 2016. **63**(5): p. 773-80.
42. Wood, J.C. and N. Ghugre, *Magnetic resonance imaging assessment of excess iron in thalassemia, sickle cell disease and other iron overload diseases*. Hemoglobin, 2008. **32**(1-2): p. 85-96.
43. Tziomalos, K. and V. Perifanis, *Liver iron content determination by magnetic resonance imaging*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(13): p. 1587-97.
44. Wood, J.C., *Estimating tissue iron burden: current status and future prospects*. Br J Haematol, 2015. **170**(1): p. 15-28.
45. Gandon, Y., et al., *Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI*. Lancet, 2004. **363**(9406): p. 357-62.
46. St Pierre, T.G., et al., *Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance*. Blood, 2005. **105**(2): p. 855-61.
47. Au, W.Y., et al., *A magnetic resonance imaging study of iron overload in hemopoietic stem cell transplant recipients with increased ferritin levels*. Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 3369-74.
48. Dignan, F.L., et al., *BCSH/BSBMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2013. **163**(4): p. 444-57.
49. Fan, C.Q. and J.M. Crawford, *Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease)*. J Clin Exp Hepatol, 2014. **4**(4): p. 332-46.
50. Chao, N., *How I treat sinusoidal obstruction syndrome*. Blood, 2014. **123**(26): p. 4023-6.

51. Mohty, M., et al., *Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: a new classification from the European Society for Blood and Marrow Transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(7): p. 906-12.
52. Carreras, E. and M. Diaz-Ricart, *The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(12): p. 1495-502.
53. Fulgenzi, A. and M.E. Ferrero, *Defibrotide in the treatment of hepatic veno-occlusive disease*. Hepat Med, 2016. **8**: p. 105-113.
54. Addo, L., et al., *Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(1): p. 175-83.
55. Zhang, L., et al., *Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(2): p. 279-87.
56. Toubai, T., et al., *Danger Signals and Graft-versus-host Disease: Current Understanding and Future Perspectives*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 539.
57. Teshima, T., P. Reddy, and R. Zeiser, *Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights*. Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(1): p. 11-6.
58. Fiuza-Luces, C., et al., *Understanding graft-versus-host disease. Preliminary findings regarding the effects of exercise in affected patients*. Exerc Immunol Rev, 2015. **21**: p. 80-112.
59. Olthof, A.W., et al., *Non-invasive liver iron concentration measurement by MRI: comparison of two validated protocols*. Eur J Radiol, 2009. **71**(1): p. 116-21.
60. Kamble, R.T., et al., *Iron overload manifesting as apparent exacerbation of hepatic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(5): p. 506-10.
61. Marcus, R.E. and E.R. Huehns, *Transfusional iron overload*. Clin Lab Haematol, 1985. **7**(3): p. 195-212.
62. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. N Engl J Med, 1999. **341**(26): p. 1986-95.
63. Olivieri, N.F., et al., *Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia*. N Engl J Med, 1994. **331**(9): p. 574-8.
64. Majhail, N.S., et al., *Iron-overload after autologous hematopoietic cell transplantation*. Leuk Res, 2009. **33**(4): p. 578-9.
65. Altes, A., et al., *Frequent severe liver iron overload after stem cell transplantation and its possible association with invasive aspergillosis*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(6): p. 505-9.
66. Rose, C., et al., *Quantification by magnetic resonance imaging and liver consequences of post-transfusional iron overload alone in long term survivors*

- after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Haematologica*, 2007. **92**(6): p. 850-3.
67. Majhail, N.S., et al., *High prevalence of iron overload in adult allogeneic hematopoietic cell transplant survivors*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008. **14**(7): p. 790-4.
68. Angelucci, E., et al., *Needle liver biopsy in thalassaemia: analyses of diagnostic accuracy and safety in 1184 consecutive biopsies*. *Br J Haematol*, 1995. **89**(4): p. 757-61.
69. Villeneuve, J.P., et al., *Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens*. *J Hepatol*, 1996. **25**(2): p. 172-7.
70. *Vitamin C stabilizes ferritin: new insights into iron-ascorbate interactions*. *Nutr Rev*, 1987. **45**(7): p. 217-8.
71. Gkouvatsos, K., G. Papanikolaou, and K. Pantopoulos, *Regulation of iron transport and the role of transferrin*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(3): p. 188-202.
72. Lane, D.J. and D.R. Richardson, *The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption!* *Free Radic Biol Med*, 2014. **75**: p. 69-83.
73. Karam, L.B., et al., *Liver biopsy results in patients with sickle cell disease on chronic transfusions: poor correlation with ferritin levels*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **50**(1): p. 62-5.
74. Brittenham, G.M., et al., *Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major*. *Am J Hematol*, 1993. **42**(1): p. 81-5.
75. Altes, A., et al., *Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2002. **29**(12): p. 987-9.
76. Knovich, M.A., et al., *Ferritin for the clinician*. *Blood Rev*, 2009. **23**(3): p. 95-104.
77. Goto, T., et al., *Hyperferritinemia after adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron*. *Int J Hematol*, 2013. **97**(1): p. 125-34.
78. Ghugre, N.R., et al., *Mechanisms of tissue-iron relaxivity: nuclear magnetic resonance studies of human liver biopsy specimens*. *Magn Reson Med*, 2005. **54**(5): p. 1185-93.
79. Busca, A., et al., *Iron overload in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: quantification of iron burden by a superconducting quantum interference device (SQUID) and therapeutic effectiveness of phlebotomy*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(1): p. 115-22.

80. Butt, N.M. and R.E. Clark, *Autografting as a risk factor for persisting iron overload in long-term survivors of acute myeloid leukaemia*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32**(9): p. 909-13.
81. McKay, P.J., et al., *Iron overload and liver dysfunction after allogeneic or autologous bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1996. **17**(1): p. 63-6.
82. Lucarelli, G., et al., *Fate of iron stores in thalassaemia after bone-marrow transplantation*. Lancet, 1993. **342**(8884): p. 1388-91.
83. Armand, P., et al., *Does iron overload really matter in stem cell transplantation?* Am J Hematol, 2012. **87**(6): p. 569-72.
84. Sorror, M.L., *Comorbidities and hematopoietic cell transplantation outcomes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2010. **2010**: p. 237-47.
85. Sorror, M.L. and R.F. Storb, *Role of comorbidities in optimizing decision-making for allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2010. **2**(2): p. e2010015.
86. Sorror, M., *Impacts of pretransplant comorbidities on allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) outcomes*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(1 Suppl): p. 149-53.
87. Sorror, M.L., B. Storer, and R.F. Storb, *Validation of the hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index (HCT-CI) in single and multiple institutions: limitations and inferences*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(6): p. 757-8.
88. Sorror, M.L., et al., *Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2912-9.
89. Armand, P., et al., *Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4586-8.
90. Vaughn, J.E., et al., *Design and Validation of an Augmented Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index Comprising Pretransplant Ferritin, Albumin, and Platelet Count for Prediction of Outcomes after Allogeneic Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(8): p. 1418-24.
91. Kataoka, K., et al., *Influence of pretransplantation serum ferritin on nonrelapse mortality after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(2): p. 195-204.
92. Wermke, M., et al., *MRI-based liver iron content predicts for nonrelapse mortality in MDS and AML patients undergoing allogeneic stem cell transplantation*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(23): p. 6460-8.
93. Ladis, V., et al., *Longitudinal study of survival and causes of death in patients with thalassemia major in Greece*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1054**: p. 445-50.

-
94. Kanda, J., et al., *Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(2): p. 208-16.
 95. von Bonsdorff, L., et al., *Erratum to "Apotransferrin administration prevents growth of Staphylococcus epidermidis in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron". [FEMS Immunol. Med Microbiol. 37 (2003) 45-51]*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. **40**(2): p. 173-80.
 96. Maertens, J., et al., *Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis*. Bone Marrow Transplant, 1999. **24**(3): p. 307-12.
 97. Drakesmith, H. and A. Prentice, *Viral infection and iron metabolism*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(7): p. 541-52.
 98. Traore, H.N. and D. Meyer, *The effect of iron overload on in vitro HIV-1 infection*. J Clin Virol, 2004. **31 Suppl 1**: p. S92-8.
 99. Marx, J.J., *Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element*. Best Pract Res Clin Haematol, 2002. **15**(2): p. 411-26.
 100. Durken, M., A. Kohlschutter, and P. Nielsen, *Non-transferrin bound iron induced by myeloablative therapy*. Br J Haematol, 1998. **101**(2): p. 393-4.
 101. Durken, M., et al., *Impaired plasma antioxidative defense and increased nontransferrin-bound iron during high-dose chemotherapy and radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(6): p. 887-94.
 102. Sahlstedt, L., et al., *Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 836-8.
 103. Evens, A.M., J. Mehta, and L.I. Gordon, *Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(7): p. 561-71.
 104. Azar, N., et al., *Liver dysfunction in allogeneic bone marrow transplantation recipients*. Transplantation, 1996. **62**(1): p. 56-61.
 105. Szurowska, E., et al., *The role of MR imaging in detection of hepatic iron overload in patients with cirrhosis of different origins*. BMC Gastroenterol, 2010. **10**: p. 13.
 106. Dong, J., et al., *The essential ATP-binding cassette protein RLII functions in translation by promoting preinitiation complex assembly*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42157-68.
 107. Chen, Z.Q., et al., *The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7452-7.
 108. Lill, R., et al., *The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins*. Biol Chem, 1999. **380**(10): p. 1157-66.

-
109. Lill, R., et al., *The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(9): p. 1491-508.
 110. Lill, R., et al., *The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins*. Eur J Cell Biol, 2015. **94**(7-9): p. 280-91.
 111. Lill, R., V. Srinivasan, and U. Muhlenhoff, *The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation*. Curr Opin Microbiol, 2014. **22**: p. 111-9.
 112. Weiss, G., *Iron and immunity: a double-edged sword*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 1**: p. 70-8.
 113. Ganz, T., *Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **306**: p. 183-98.
 114. Ekiz, C., et al., *The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system*. Hematol J, 2005. **5**(7): p. 579-83.
 115. Galhenage, S.P., C.H. Viiala, and J.K. Olynyk, *Screening for hemochromatosis: patients with liver disease, families, and populations*. Curr Gastroenterol Rep, 2004. **6**(1): p. 44-51.
 116. Pietrangelo, A., A. Caleffi, and E. Corradini, *Non-HFE hepatic iron overload*. Semin Liver Dis, 2011. **31**(3): p. 302-18.
 117. Pietrangelo, A., *Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Gastroenterology, 2010. **139**(2): p. 393-408, 408 e1-2.
 118. Pietrangelo, A., *Iron chelation beyond transfusion iron overload*. Am J Hematol, 2007. **82**(12 Suppl): p. 1142-6.
 119. Pietrangelo, A. and C. Trautwein, *Mechanisms of disease: The role of hepcidin in iron homeostasis--implications for hemochromatosis and other disorders*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004. **1**(1): p. 39-45.
 120. Baez, A. and J. Shiloach, *Increasing dissolved-oxygen disrupts iron homeostasis in production cultures of Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016.
 121. Obirikorang, C., et al., *Anaemia and Iron Homeostasis in a Cohort of HIV-Infected Patients: A Cross-Sectional Study in Ghana*. AIDS Res Treat, 2016. **2016**: p. 1623094.
 122. Gomez, S., et al., *Comparative Analysis of Iron Homeostasis in Sub-Saharan African Children with Sickle Cell Disease and Their Unaffected Siblings*. Front Pediatr, 2016. **4**: p. 8.
 123. Cunningham-Rundles, S., et al., *Effect of transfusional iron overload on immune response*. J Infect Dis, 2000. **182 Suppl 1**: p. S115-21.
 124. Toma, A., et al., *Infections in myelodysplastic syndromes*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1459-70.

-
125. Kontoghiorghes, G.J., et al., *The role of iron and chelators on infections in iron overload and non iron loaded conditions: prospects for the design of new antimicrobial therapies*. Hemoglobin, 2010. **34**(3): p. 227-39.
126. Ding, C., et al., *Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens*. Mol Microbiol, 2014. **93**(1): p. 10-23.
127. Takem, E.N., A. Roca, and A. Cunningham, *The association between malaria and non-typhoid Salmonella bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review*. Malar J, 2014. **13**: p. 400.
128. Ibrahim, A.S., *Host-iron assimilation: pathogenesis and novel therapies of mucormycosis*. Mycoses, 2014. **57 Suppl 3**: p. 13-7.
129. Markey, K.A., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice*. Blood, 2014. **124**(3): p. 354-62.
130. Holtan, S.G., M. Pasquini, and D.J. Weisdorf, *Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update*. Blood, 2014. **124**(3): p. 363-73.
131. Socie, G. and J. Ritz, *Current issues in chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2014. **124**(3): p. 374-84.
132. Cherayil, B.J., *Iron and immunity: immunological consequences of iron deficiency and overload*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(6): p. 407-15.
133. Kumar, V. and V.P. Choudhry, *Iron deficiency and infection*. Indian J Pediatr, 2010. **77**(7): p. 789-93.
130. Lubert Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2003, str. 154, (Wyd. 2 popr.)
131. Antczak, Myśliwiec, Pruszczyk, *Wielka Interna, Hematologia*, Medical Tribune Polska, Warszawa 2011
132. ESH – EBMT Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation (2008).
133. Zalecenia postępowania diagnostyczno – terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Transplantacja krwiotórczych komórek macierzystych. 2013. S. Giebel.

[5, 9, 13, 26, 106-133]